Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
Ordentlicher Lehrstuhl und Abteilung Innere Medizin II
Vorstand: Professor Dr. H. D. Waller
und Robert Bosch Krankenhaus Stuttgart
Zentrum für Innere Medizin
Chefarzt: Professor Dr. W. Wilmanns

Die Desoxycytidinmonophosphat-Desaminase in normalen und leukämischen Leukozyten und Knochenmarkzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Brigitte Schalhorn, geb. Manske
aus Gelsenkirchen-Horst

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546528_0031

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
Ordentlicher Lehrstuhl und Abteilung Innere Medizin II
Vorstand: Professor Dr. H. D. Waller
und Robert Bosch Krankenhaus Stuttgart
Zentrum für Innere Medizin
Chefarzt: Professor Dr. W. Wilmanns

Die Desoxycytidinmonophosphat-Desaminase in normalen und leukämischen Leukozyten und Knochenmarkzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Brigitte Schalhorn, geb. Manske
aus Gelsenkirchen-Horst

1974

Dekan : Professor Dr. U. Feine

1. Berichterstatter : Professor Dr. W. Wilmanns
(Professor Dr. H.D. Waller)

2. Berichterstatter : Privatdozent Dr. D. Kummer

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Methodik	5
2.1. Materialien	5
2.2. Isolierung und Zytolyse der peripheren Leukozyten und Knochenmarkzellen.....	5
2.2.1. Leukozyten	5
2.2.2. Knochenmarkzellen	6
2.3. Aufbewahrung des Zytolysats	6
2.4. Enzymaktivitätsbestimmung	6
2.4.1. Spektrophotometrisch in Anlehnung an die von Maley beschriebene Methode	6
2.4.2. Radioaktiver Testansatz mit folgender dünnschichtchromatographischer Trennung der markierten Reaktionsprodukte	7
2.4.2.1. Enzymansatz	7
2.4.2.2. Chromatographische Trennung	8
2.4.2.3. Identifizierung der Reaktionsprodukte	10
2.4.2.4. Messung der Impulsraten und Aktivitätsberechnung	10
2.5. Statistische Methoden	11
3. Ergebnisse	13
3.1. Eigenschaften der dCMP-Desaminase in weißen Blutkörperchen leukämischer Patienten	13
3.1.1. Komponenten-Abhängigkeit	13
3.1.2. Abhängigkeit von der Enzymmenge	14
3.1.3. Zeitabhängigkeit	15
3.1.4. pH-Abhängigkeit	17
3.1.5. Substratabhängigkeit und Michaelis-Menten-Konstante	18
3.1.6. Einfluß von dCTP und TTP auf die dCMP-Desaminase	20

Seite

3.1.7. Ergebnisse der radioaktiven Testansätze 23

3.1.8. Vergleich zwischen spektralphotometrisch und radioaktiv bestimmter dCMP-Desaminase-Aktivität 24

3.2. dCMP-Desaminase bei Normalpersonen und Patienten mit verschiedenen leukämischen Erkrankungen 25

3.2.1. Vergleich zwischen peripheren Leukozyten von Normalpersonen und Patienten mit Leukämien 25

3.2.2. Gegenüberstellung von peripheren Zellen und Knochenmarkzellen 27

3.2.3. Verschiedene Formen akuter Leukämien 28

3.2.4. Vergleich der Enzym-Aktivitäten von dCMP-Desaminase und Thymidylatsynthetase 29

3.3. Verhalten der dCMP-Desaminase unter zytostatischer Therapie 29

3.3.1. Methotrexat 29

3.3.2. Cytosinarabinosid 31

3.3.3. Hydroxyurea 35

4. Diskussion 38

4.1. Bedingungen der Testansätze 38

4.2. Aktivatoren und Inhibitoren der dCMP-Desaminase und ihre Bedeutung für den Nukleotidstoffwechsel 40

4.3. Bedeutung der dCMP-Desaminase für die Zellproliferation 42

4.4. Das Verhalten der dCMP-Desaminase unter zytostatischer Therapie im Vergleich zu Thymidylatsynthetase, Thymidinkinase und Dihydrofolatreduktase.... 44

5. Zusammenfassung 49

6. Literaturverzeichnis 50

Abkürzungen

CdR = dC	= Cytosindesoxyribosid
UdR = dU	= Uracildesoxyribosid
TdR = dT	= Thymindesoxyribosid
dCMP	= 2-Desoxycytidin-5'monophosphat
dUMP	= 2-Desoxyuridin-5'monophosphat
TMP	= 2-Desoxythymidin-5'monophosphat
dCTP	= 2-Desoxycytidin-5'triphosphat
TTP	= 2-Desoxythymidin-5'triphosphat
dATP,dGTP	= 2-Desoxyadenosin-,Desoxyguanosin-triphosphat
FH_2,FH_4	= Dihydro-,Tetrahydrofolsäure
DNS,RNS	= Desoxyribonucleinsäure,Ribonucleinsäure
AL	= Akute Leukose
AML	= Akute myeloische Leukämie
ALL	= Akute Lymphoblasten-Leukämie
CML	= Chronische myeloische Leukämie
L.Retik.	= Leukämische Retikulose
Ara-C	= 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin
Mtx	= Methotrexat
HU	= Hydroxyharnstoff

1. EINLEITUNG

Die Desoxycytidinmonophosphat-Desaminase (4-aminopyrimidone-2',5'-phosphate aminohydrolase, E.C. 3.5.4.5.) wurde von E.SCARANO (39) in Homogenaten befruchteter Eier und Embryonen des Seeigels sowie von G.F.MALEY und F.MALEY in Homogenaten embryonaler Rattenleber erstmals untersucht (26). Weitere Untersuchungen wiesen das Enzym in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen (8), in Hühnerembryo-Homogenaten (29), in Leukozyten (42,43), in regenerierender Rattenleber (21) und in verschiedenen anderen schnell wachsenden Geweben nach. Auch in einigen Mikroorganismen konnte die dCMP-Desaminase dargestellt werden (16,30). Erstaunlicherweise wurde eine ausgeprägte Aktivität des Enzyms auch in mitotisch inaktivem Gewebe wie normaler menschlicher Leber, Kaninchen- und Affenleber gefunden (22,29).

Die dCMP-Desaminase hat eine relativ große Substratspezifität: dC, dCDP und dCTP werden nicht von ihr desaminiert, wohl aber in der 5'-Stellung des Pyrimidin-Ringes substituierte Analoge (22). Die Desaminierung des dCMP läßt sich durch folgende Reaktionsgleichung ausdrücken:

(1) $\quad dCMP + H_2O \longrightarrow dUMP + NH_3$

dUMP stammt jedoch nicht nur aus der Reaktion der dCMP-Desaminase, sondern wird auch 1. durch die Thymidinkinase aus dU und 2. aus UMP durch Übertragung der Desoxyribosyl-Gruppe gebildet (siehe Abb. 1).

dUMP kann einmal durch Phosphorylasen zu dU dephosphoryliert werden; andererseits ist dUMP das Substrat der Thymidylatsynthetase (53) und geht damit in die de-novo-Synthese des DNS-Thymin ein.

(2) $\quad dUMP + N^5,N^{10}\text{-}5,6,7,8\text{-Methylen-}FH_4 \longrightarrow dTMP + 7,8\text{-}FH_2$

Methylen-FH_4 wird auch als aktiver Formaldehyd bezeich-

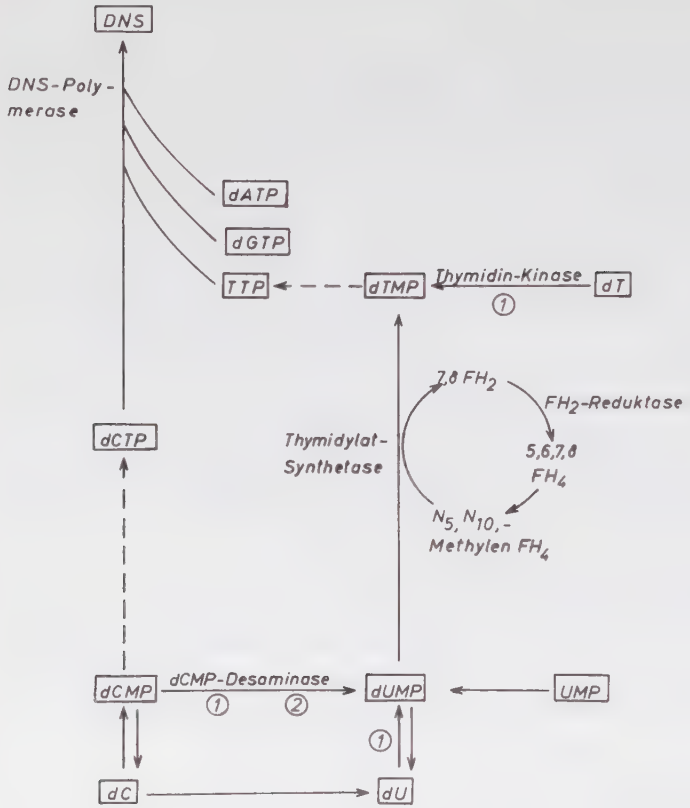


Abb. 1: Bedeutung der dCMP-Desaminase für die DNS-Synthese. ① = Hemmende Wirkung von TTP, ② = aktivierende Wirkung von dCTP.

net, der in der Thymidylatsynthetase-Reaktion zur Methylgruppe reduziert wird. Da hierbei eine Oxydation von FH_4 zu FH_2 erfolgt, ist die FH_2-Reduktase bei der Thyminmethylgruppen-de-novo-Synthese von essentieller Bedeutung (50). Ein anderer Weg zum Thymidinmonophosphat, der sog. salvage pathway, der unter physiologischen Bedingungen von geringem Umfang ist, führt über die Thymidinkinase, durch die Thymidin zu TMP phosphoryliert wird (49).

$$(3)\quad TdR + ATP \xrightarrow{Mg^{++}} TMP + ADP$$

Die weitere Phosphorylierung zu Thymidintriphosphat verläuft bei beiden Wegen gemeinsam über die TMP-Kinase und TDP-Kinase zum TTP, das zusammen mit den anderen Triphosphaten durch die DNS-Polymerase in die DNS eingebaut wird. Eine Übersicht über diese Zusammenhänge gibt Abb. 1.

Die dCMP-Desaminase unterliegt einer Rückkopplungskontrolle durch dCTP und TTP (27,41). Wie die Thymidinkinase wird die dCMP-Desaminase durch TTP in ihrer Aktivität gehemmt. Diese Hemmung scheint nicht kompetitiv zu sein und kann durch gleiche Mengen dCTP wieder aufgehoben werden (25,28). dUMP, dTMP (19), dGMP und GMP hemmen in geringerem Maße ebenfalls die dCMP-Desaminase. Auch diese Hemmung kann durch dCTP wieder rückgängig gemacht werden. Als kompetitiver Hemmstoff wurde 4-N-Hydroxy-dCMP (29) gefunden.

Für die de-novo-Synthese des TMP ist die Thymidylatsynthetase das geschwindigkeitsbegrenzende Enzym. Die FH_2-Reduktase hat eine um ein Vielfaches höhere Aktivität (33). SILBER (43) zeigte an Leukozyten-Zytolysat, daß die dCMP-Desaminase eine um den Faktor 1000 höhere Aktivität aufweist als die Thymidylatsynthetase. Unter der Hemmung mit TTP jedoch könnte die dCMP-Desaminase eine niedrigere Aktivität als die Thymidylatsynthetase aufweisen und damit die Geschwindigkeit der de-novo-Synthese der Thyminmethylgruppen begrenzen (27,43).

Die Aktivität der dCMP-Desaminase kann spektrophotometrisch und durch Verwendung von ^{14}C-dCMP durch chromato-

graphische Trennung der radioaktiven Reaktionsprodukte bestimmt werden. Die spektrophotometrische Bestimmungsmethode beruht auf der Extinktionsabnahme bei λ= 290 nm infolge Abnahme der dCMP-Konzentration. Diese Methode ist relativ einfach durchzuführen, sie ist aber nicht so empfindlich wie die Isotopen-Methode.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Charakterisierung der dCMP-Desaminase in menschlichen Leukozyten und Knochenmarkzellen sowie die Beantwortung folgender Fragen:

1. Welche Unterschiede bestehen zwischen den peripheren Leukozyten und Knochenmarkzellen?
2. Weicht die durchschnittliche Aktivität der dCMP-Desaminase bei Leukämien von der bei Normalpersonen und Patienten mit Leukozytose und Linksverschiebung ab?
3. Wie verhält sich das Enzym unter Behandlung mit zytociden Agenzien bei Leukämien?
4. Besteht eine Korrelation zwischen Aktivität der dCMP-Desaminase und den Aktivitäten anderer Schlüsselenzyme der DNS-Synthese? In diesem Zusammenhang wurden die im Labor von Professor Wilmanns bestimmten Enzymaktivitäten der Thymidylat-Synthetase, Dihydrofolatreduktase und Thymidinkinase mitverwertet.

2. METHODIK

2.1. Materialien

Desoxycytidin-5'-Monophosphat: Calbiochem,Los Angeles,USA; Desoxycytidin-5'-Triphosphat-Natriumsalz, Desoxyuridin, Desoxycytidin, Uracil, Cytosin, Desoxythymidin-5'-Monophosphat: Serva AG,Heidelberg; Desoxycytidin-^{14}C-5'-Monophosphat-Ammoniumsalz,491 mCi/mMol: Radiochemical Center/ Buchler,Amersham/Braunschweig; MN 300 PEI Cellulose-Platten: Macherey,Nagel & Co, Düren; die restlichen Substanzen stammen von der Firma E.Merck AG,Darmstadt.

2.2. Isolierung und Zytolyse der peripheren Leukozyten und Knochenmarkzellen

Die Isolierung und Zytolyse erfolgte nach der von WILMANNS (49) beschriebenen Methode:

2.2.1. Leukozyten

Venöses Blut wurde in silikonisierten Gläsern aufgefangen und mit 5%-iger Magnesium-Titriplex-Lösung im Verhältnis 1 : 10 versetzt. Es folgte eine 30-minütige Sedimentation bei 37° C. Die entstandene Leukozyten-Manchette mit ihrer Erythrozyten- und Thrombozyten-Verunreinigung wurde mit einer silikonisierten Pipette abgehoben und in Cellulosenitrat-Röhrchen in der Servall-Kühlzentrifuge bei 0° C und 175 g für 10 min. zentrifugiert. Die weiteren Arbeitsgänge wurden bei 0 - 3° C durchgeführt: Zur Hämolyse der Erythrozyten wurde das Sediment 3 min. lang in 3 ml 0,83%-iger NH_4Cl-Lösung suspendiert und dann zentrifugiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen und Zentrifugieren mit Calcium-freier Ringer-Phosphat-Glucose-Lösung. Die letzte Suspension wurde mit 10^{-3} M Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,4) auf eine Zellzahl von ca. 10^8 Zellen/ml eingestellt und 1 Stunde lang der Zytolyse überlassen. Anschließend wurden die Zellstromata durch 30 min. Zentri-

fugieren bei 38000 g abgetrennt. Die Enzymaktivitäts-Bestimmung erfolgte aus dem Überstand.

2.2.2. Knochenmarkzellen

Das mit einer silikonisierten Spritze aspirierte Sternalmark wurde sofort nach der Punktion in eine eisgekühlte Mischung aus Ringer-Phosphat-Glucose-Lösung und 5% Magnesium-Titriplex (pH 7,4) überführt. Danach wurde 10 min. in der Kühlzentrifuge bei 150 g zentrifugiert. Es folgte die Isolierung und Zytolyse der kernhaltigen Zellen und die Hämolyse der Erythrozyten wie unter 2.2.1. angegeben.

2.3. Aufbewahrung des Zytolysats

In den meisten Fällen wurde die Enzymaktivität in frisch hergestelltem Zytolysat bestimmt. Nach 24 Stunden Lagerung bei 4° C sinkt die Aktivität des Zytolysats auf ca. 50% des Ausgangswertes ab. Fügt man vor der Aufbewahrung dCTP und $MgCl_2$ in den selben Konzentrationen, wie sie zum Enzymansatz genommen werden, hinzu, bleibt die volle Aktivität über mindestens 24 Stunden erhalten.

2.4. Enzymaktivitäts-Bestimmung

2.4.1. Spektrophotometrisch in Anlehnung an die von MALEY beschriebene Methode (29)

In einem Ansatzvolumen von 0,5 ml befanden sich:

1 µMol dCMP
0,04 µMol dCTP
1 µMol $MgCl_2$
50 µMol Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,9
Zytolysat von 0,5 - 1,0 x 10^7 Zellen

Nach einer Inkubationszeit von 20 min. wurde die Reaktion, die durch Zugabe des Zytolysats gestartet worden war, durch Überpipettieren von 0,1 ml des Ansatzes in 2,9 ml 10%-ige $HClO_4$ beendet. Nach gründlichem Schütteln und einer Aufbewahrung bei 4° C für ca. 2 Stunden wurde das

denaturierte Eiweiß abzentrifugiert. Der Überstand wurde im kurzwelligen UV-Licht bei λ = 290 nm im Zeiss-Spektralphotometer PM Q II gegen eine Nullminuten-Probe gemessen.

Berechnung der Aktivität:

Die Aktivität wurde aus der Abnahme der dCMP-Konzentration anhand der Extinktionsabnahme bei λ = 290 nm errechnet. Der Extinktions-Koeffizient von dCMP beträgt bei saurem pH bei dieser Wellenlänge 10 cm^2/mMol. Die spezifische Aktivität wurde ausgedrückt in U/10^{10} Zellen, entsprechend einem Substratumsatz von 1 µMol/min/10^{10} Zellen unter den oben angegebenen Versuchsbedingungen.

Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach folgendem Prinzip:

$$\text{dCMP-Desaminase } (U/10^{10}\ Z) = \frac{\Delta E_{dCMP}}{\varepsilon_{dCMP} \cdot t} \cdot F$$

In den Faktor F gehen die eingesetzte Zellzahl Z, das Ansatzvolumen (0,5 ml) und der Verdünnungsfaktor ein, der sich aus dem Überpipettieren von 0,1 ml des Ansatzvolumens zu 2,9 ml der $HClO_4$-Lösung ergibt. Daraus läßt sich für unsere Testbedingungen folgende Größe für den Faktor F errechnen:

$$F = \frac{10^{10} \cdot 15}{Z}$$

2.4.2. Radioaktiver Testansatz mit folgender dünnschichtchromatographischer Trennung der markierten Reaktionsprodukte

2.4.2.1. Enzymansatz

Nach anfänglichen Versuchen, in denen ^{3}H-dCMP oder höhere Aktivitäten an ^{14}C-dCMP eingesetzt wurden, bewährte sich folgender Inkubationsansatz, der bezüglich der Konzentra-

tionen der eingesetzten Substanzen dem unter 2.4.1.1. genannten photometrischen Ansatz entspricht. In einem Gesamtansatzvolumen von 0,1 ml befanden sich:

0,2 µMol ^{14}C-dCMP (entsprechend ca. 200000 cpm)
8 nMol dCTP
0,2 µMol $MgCl_2$
10 µMol Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,9
Zytolysat von ca. 0,2 · 10^7 Zellen

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates gestartet und durch Erhitzen auf 100° C für 2 min. nach einer Inkubationsdauer von 20 min. beendet. Nach dem Abkühlen wurde der Eiweiß-Niederschlag abzentrifugiert.

2.4.2.2. Chromatographische Trennung (Abb. 2)

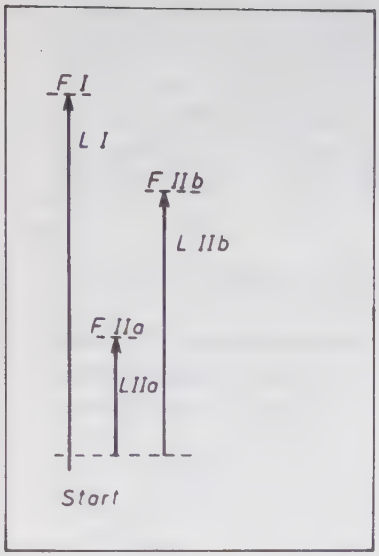
Zur Analyse der Reaktionsprodukte wurde eine Dünnschichtchromatographie auf MN-Polygram-Cellulose-Platten 300, Polyäthylenimin-Cellulose (PEI-Cellulose-Folien) nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Vorlauf mit aqua bidest. zur Abtrennung der Nukleoside und Basen (L I),
2. zweistufige Chromatographie mit einem sauren und einem neutralen Lösungsmittel zur Trennung der Nukleotide (L IIa und L IIb).

Ähnliche Trennungen auf PEI-Folien wurden von RANDERATH (36) beschrieben.

Nach Vorentwicklung der PEI-Dünnschicht-Folien in destilliertem Wasser und nachfolgender Trocknung über Nacht bei Raumtemperatur wurden ca. 2,5 µl des enteiweißten Enzymansatzes tropfenweise mit einer Mikroliter-Pipette aufgetragen. Der Durchmesser des aufgetragenen Fleckes betrug maximal 5 mm. Nach endgültiger Trocknung im nichterwärmten Luftstrom erfolgte die chromatographische Abtrennung der Nukleoside mit aqua bidest. als Laufmittel. Bei diesem Schritt blieben die Nukleotide am Start liegen (36).

Der aus einer zweistufigen Chromatographie bestehende



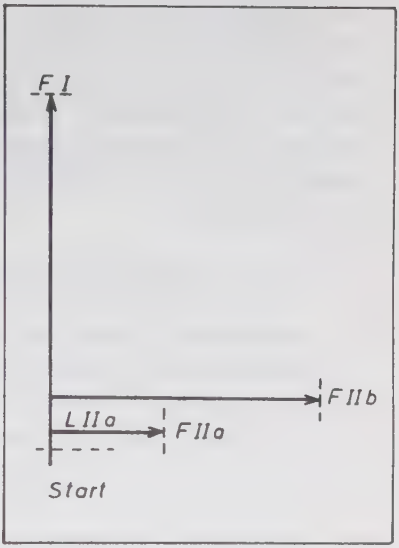


Abb. 2: Schematische Darstellung der beiden Möglichkeiten der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der im Testansatz gebildeten Reaktionsprodukte (Einzelheiten siehe Text).

2. Teil der Auftrennung wurde meist in derselben Laufrichtung wie der aqua-bidest.-Vorlauf durchgeführt, teilweise aber auch senkrecht zu diesem in einer zweiten Dimension.

In Abb. 2 werden beide Verfahren noch einmal anhand einer schematischen Skizze dargestellt. Die Ausführung, bei der alle chromatographischen Trennungen in einer Laufrichtung erfolgen, bezeichnen wir im folgenden als mehrstufige, die andere als zweidimensionale.

Im einzelnen schloß sich an den aqua-bidest.-Vorlauf (L I)

zunächst eine Zwischentrocknung bei Raumtemperatur an. Darauf folgte eine Entwicklung mit 1 N Essigsäure (L IIa) bis zu einer Höhe von 4 - 5 cm und anschließend ohne Zwischentrocknung ein Lauf mit 0,3 M Lithiumchlorid (L IIb) bis zu einer Höhe von 12 cm. Die R_f-Werte lassen sich wegen der Schwierigkeit einer exakten Laufhöheneinhaltung bei der zweistufigen Chromatographie nur für das erste Lösungsmittel 1 N Essigsäure angeben: dCMP 0,81, dUMP 0,35, dC und dU 0,96.

2.4.2.3. Identifizierung der Reaktionsprodukte

Die Reaktionsprodukte wurden durch Betrachtung im UV-Licht und Vergleich mit reinen Kontrollsubstanzen identifiziert. Im kurzwelligen UV-Licht (Desaga UVIS, 250nm) erscheinen die Pyrimidinkörper als dunkelblaue Flecke. Um kleinere Mengen der ^{14}C-markierten Nukleotide wiederzufinden, wurde zusätzlich jedoch eine Autoradiographie durchgeführt. Nach vollständiger Trocknung der PEI-Cellulose-Schicht wurde ein Röntgen-Film auf der Schichtseite der Folie befestigt und für ca. 5 Tage in der Dunkelkammer exponiert. Ein typisches Autoradiogramm wird in Abb. 11 gezeigt.

2.4.2.4. Messung der Impulsraten und Aktivitätsberechnung

Die so ermittelten Flecke wurden ausgeschnitten und die erhaltenen Plättchen zur Messung der ^{14}C-Aktivität mit der PEI-Schicht zum Lumen in Meßgefäße mit 15 ml Scintillator-Lösung (4 g Diphenyloxazol und 100 mg 1,4-bis-2(5-Phenyloxazol)-Benzen gelöst in 1000 ml Toluol p.a.) gelegt. Die Messung erfolgte im TRICARB Scintillation Spectrometer (Fa. Packard Instrument Company). Um eine Übersicht über die Gesamtverteilung der eingesetzten Radioaktivität zu erhalten, wurden auch die radioaktivitätsfrei erscheinenden Flächen gemessen. Die Impulsraten wurden um den Leerwert vermindert, den ein aktivitätsfreies PEI-Plättchen aus parallel entwickelter Folie, von gleicher Form und Größe wie die gemessenen, ergab. Der Leerwert eines Plätt-

chens von 0,5 • 1,0 cm betrug im Durchschnitt 35 cpm.

Die Aktivität der einzelnen Flecke wurde in Prozent der Gesamt-Aktivität angegeben. Zur Bestimmung der Enzymaktivität der dCMP-Desaminase wurde aber der Prozentsatz P der ^{14}C-dUMP-Impulse nicht auf die Gesamt-Radioaktivität, sondern auf die Summe der Impulsraten von ^{14}C-dCMP und ^{14}C-dUMP nach 20-minütiger Inkubationsdauer bezogen (Begründung siehe unter Ergebnisse der radioaktiven Testansätze unter 3.1.7.).

Unter Berücksichtigung der eingesetzten Substratmenge (0,02 µMol dCMP), der eingesetzten Zellzahl (Z) in 10^7 Zellen und der Inkubationsdauer t in min. ergibt sich folgende Formel für die Berechnung der dCMP-Desaminase-Aktivität:

$$\frac{dUMP\ \% \cdot 0{,}02}{t} \cdot \frac{10^{10}}{Z} \quad (U/10^{10}Z)$$

2.5. Statistische Methoden

Die für die statistische Berechnung notwendigen Tabellen und Formeln wurden R.C.CAMPBELL (5) und DOCUMENTA GEIGY (7) entnommen. Die Standard-Abweichung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{S \cdot y}{N - 1}}$$

Zum Vergleich der dCMP-Desaminase-Aktivität wurde zunächst die Übereinstimmung oder Abweichung der Schätzwerte der Varianzen mit dem Fisher-Test untersucht (5, S.121). Bei Übereinstimmung wurde der Student-Test

---

Für die Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der statistischen Berechnung danke ich an dieser Stelle Herrn Dr. R.M.Schmülling.

durchgeführt:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s\sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}}$$

Bei Abweichung wurde der d-Wert nach dem Behrens-Fisher-Test berechnet:

$$d = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n} + \frac{s_2^2}{m}}}$$

Die Überschreitungswahrscheinlichkeit p wurde in den entsprechenden Tabellen (5) unter Berücksichtigung der errechneten t- und d-Werte und der Freiheitsgrade abgelesen. Der Berechnung des Korrelations-Koeffizienten diente folgende Formel:

$$r = \frac{s_{xy}}{s_x \cdot s_y} = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} \cdot S_{yy}}}$$

Die Signifikanz der Korrelations-Koeffizienten r wurde ebenfalls den entsprechenden Tabellen (7) entnommen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Eigenschaften der dCMP-Desaminase in weißen Blutkörperchen leukämischer Patienten

3.1.1. Komponenten-Abhängigkeit

Wie aus Tab. 1 ersichtlich, ist die dCMP-Desaminase-Aktivität bei Fehlen von dCTP und $MgCl_2$ etwa 50% niedriger als die Ausgangsaktivität. Zusatz von Mercaptoäthanol zum Routine-Ansatz hat keinen Einfluß auf die Enzymaktivität.

	E/20 min.	U/10^{10} Z	Aktivität %
Kompletter Ansatz	0,230	17,7	100
ohne Enzym	0,020	1,5	8,7
ohne dCMP	0,008	0,6	3,5
ohne dCTP & $MgCl_2$	0,105	8,1	45,7
ohne dCTP	0,160	12,6	69,5
ohne $MgCl_2$	0,220	16,9	95,7
ohne Phosphat-Puffer	0,040	3,1	1,7
Zusatz v. Mercaptoäthanol	0,210	16,1	91,5

Tabelle 1: Komponenten-Abhängigkeit der dCMP-Desaminase. Pat. Bä.,W., leukämische Lymphosarkomatose. Eingesetzte Zellzahl 1,02 · 10^7 Zellen. Mercaptoäthanol in einer Konzentration von 0,05 M, übrige Konzentrationen wie im Routine-Ansatz.

Die $MgCl_2$-Abhängigkeit konnte durch Zufügen von Dinatrium-EDTA bewiesen werden. Bei einer Konzentration von 10 mM EDTA sinkt die Enzymaktivität auf ca. 2/3 der Ausgangsaktivität ab (siehe Tabelle 2).

Von SONODA wurde Äthylenglykol als besonders effektiver Stabilisator der dCMP-Desaminase hervorgehoben (45). Wie in Tab. 3 abzulesen ist, läßt sich mit Äthylenglykol gegenüber dem Ansatz mit dCTP und $MgCl_2$ jedoch keine weitere Aktivitätssteigerung erzielen.

Patient	Diagnose	Routine-Ansatz Aktivität $U/10^{10}$ Zellen	Routine-Ansatz+EDTA EDTA-Konz. mM	Aktivität $U/10^{10}$ Z
Wo.,J.	AML	7,2	8	5,9
Kl.,R.	Mononukl.	7,4	10	3,9
Ko.,R.	CML	8,6	10	6,9

Tabelle 2: Vergleich zwischen der Enzymaktivität im Routine-Ansatz und der Aktivität nach Zufügen verschiedener Mengen Na_2-EDTA.

Pat.	Diagnose	dCMP-Desaminase-Aktivität($U/10^{10}$Z) Normalansatz	Normalans. mit Zusatz v. Äthylenglykol	Ersatz von dCTP/$MgCl_2$ durch Äthylenglykol
Re.,H.	CML	7,3	-	5,0
Ma.,N.	AML	49,5	-	50,0
Ma.,N.	AML	14,3	-	8,4
Wi.,I.	CML	37,1	22,3	-
Wi.,I.+	CML	88,5	64,5	-

Tabelle 3: Vergleich der Enzymaktivitäten im Normalansatz mit Ansätzen, die entweder zusätzlich zu dCTP/$MgCl_2$ oder als Ersatz für dCTP/$MgCl_2$ Äthylenglykol (3,6 M) als Stabilisator enthalten. Untersuchung an peripheren Leukozyten und Knochenmarkzellen (+).

3.1.2. Abhängigkeit von der Enzymmenge

Zur Darstellung der Enzym-Abhängigkeit wurde das Zytolysat peripherer Leukozyten eines Patienten mit chronischer Myelose vor zytostatischer Therapie untersucht. Die Re-

aktion verläuft linear bis zum 2,5-fachen der normalerweise eingesetzten Zytolysat-Menge, wie aus Abbildung 3 ersichtlich ist.

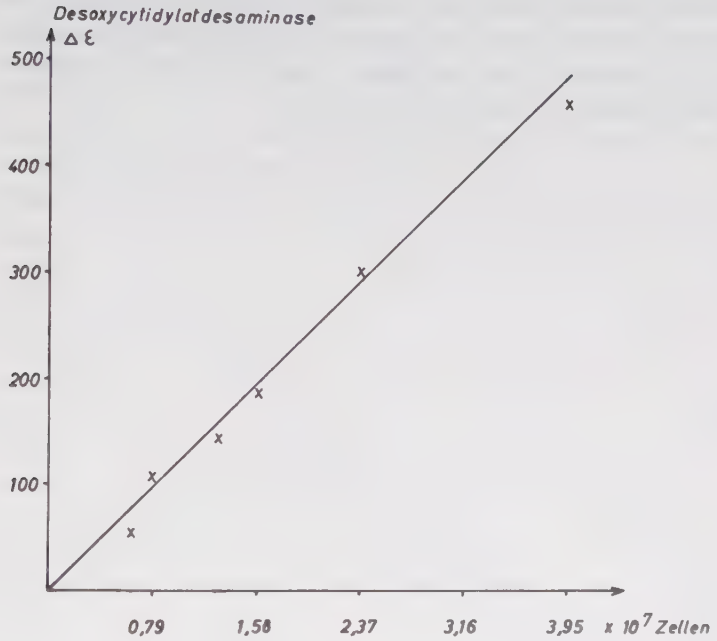


Abb. 3: Abhängigkeit der dCMP-Desaminase von der Zellzahl des eingesetzten Zytolysats, ausgedrückt durch die Extinktionsabnahme bei λ = 290 nm. Pat.: K.,O., CML.

3.1.3. Zeitabhängigkeit

Die Zeitabhängigkeit der dCMP-Desaminase wurde am Zytolysat peripherer Leukozyten eines Patienten mit chronischer Myelose im Blastenschub untersucht (siehe Abbildung 4). Hier wie in sechs anderen Fällen wurde eine

lineare Zeitabhängigkeit über mindestens 30 min. nachgewiesen. In einem Fall mit besonders hoher spezifischer Aktivität entstand eine lineare Abhängigkeit allerdings nur bis zu einer Dauer von 20 min.. Daher wählten wir für den Routine-Versuch eine Inkubationsdauer von 20 min. und entnahmen nach 10 oder 15 min. noch eine 2. Probe zur Absicherung des Ergebnisses. Nach MALEY und MALEY (26) ist die Linearität nur bis zu einem Umsatz von 60% der eingesetzten Substratmenge gewährleistet.

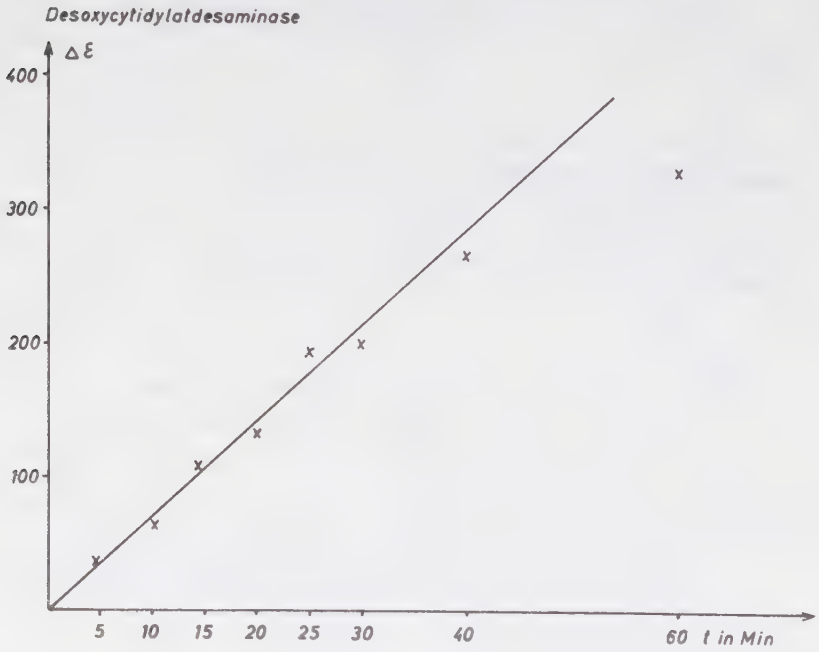


Abb. 4: Abhängigkeit der dCMP-Desaminase von der Inkubationsdauer, ausgedrückt durch die Extinktionsabnahme bei 290 nm. Pat.: R.,H., Blastenschub bei CML. Zytolysat von $1{,}3 \cdot 10^7$ Zellen im Inkubationsansatz.

3.1.4. pH-Abhängigkeit

Zur Prüfung der pH-Abhängigkeit wurde das Zytolysat peripherer Leukozyten eines Patienten mit akuter undifferenzierter Leukämie untersucht. In Abbildung 5 ist die Enzymaktivität gegen den pH-Wert des eingesetzten Phosphat-Puffers aufgetragen. Es ergibt sich ein breites Plateau optimaler Aktivität mit 2 Gipfeln bei pH 7,5 und 7,9. Bei pH 7,3 und 8,2 ist die Aktivität stark abgefallen. In weiteren Versuchen wurden bei verschiedenen Patienten unterschiedliche Varianten dieser doppelgipfligen pH-Abhängigkeitskurve festgestellt.

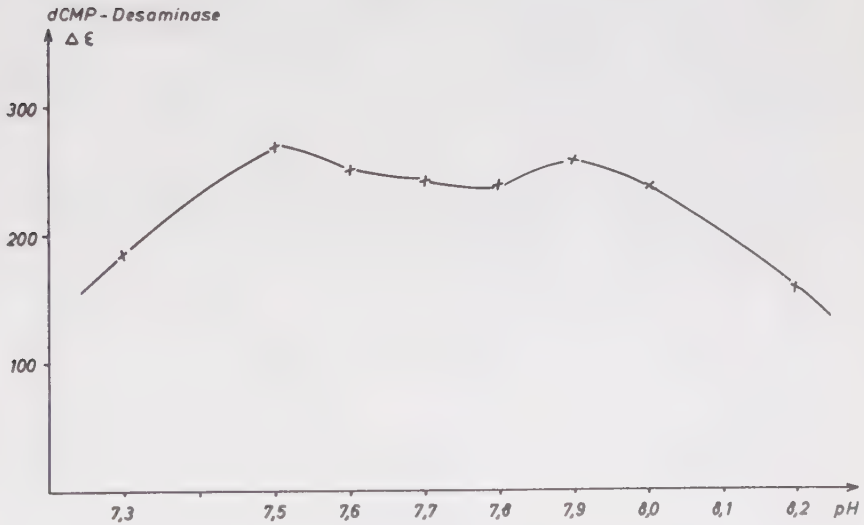


Abb. 5: pH-Abhängigkeit der dCMP-Desaminase, ausgedrückt durch die Extinktionsabnahme bei 290 nm. Pat.: M.,G., akute undiff. Leukose. Eingesetzte Zellzahl: $1{,}1 \cdot 10^7$.

3.1.5. Substratabhängigkeit und Michaelis-Menten-Konstante

In Abbildung 6 ist die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der dCMP-Konzentration im Inkubationsansatz wiedergegeben. Ab einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-3}$ M bleibt die Enzymaktivität praktisch konstant. Die Michaelis-Konstante für dCMP wurde entsprechend der Abbildung 7 nach LINEWEAVER und BURK (20) berechnet. Dabei ergab sich eine K_M für dCMP von $1{,}02 \cdot 10^{-3}$ M.

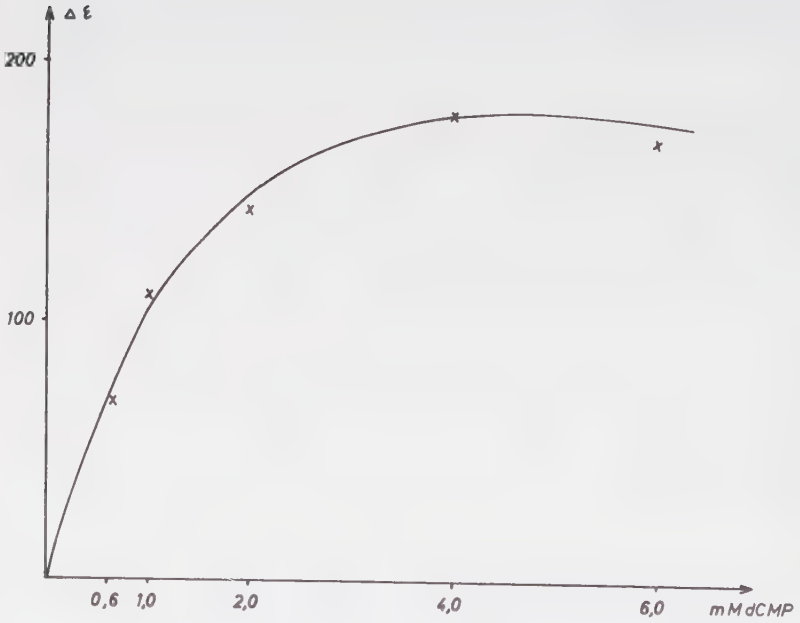


Abb. 6: Abhängigkeit der dCMP-Desaminase von der eingesetzten Substrat-Konzentration. Pat.: St.,G., CML, eingesetzte Zellzahl $0{,}98 \cdot 10^7$ Zellen.

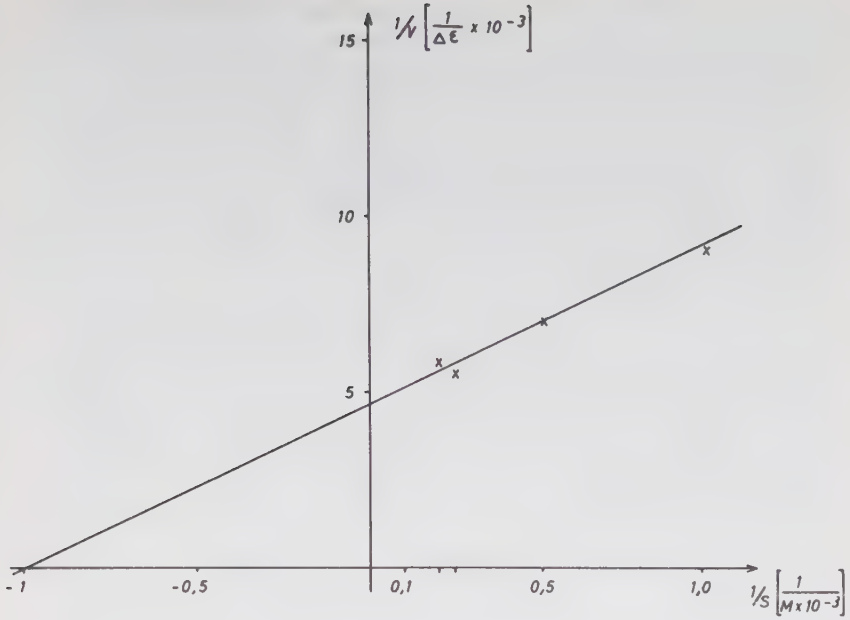


Abb. 7: Bestimmung der Michaelis-Konstante der dCMP-Desaminase nach Lineweaver & Burk. Pat.: St.,G., CML, eingesetzte Zellzahl 0,98 · 10^7.

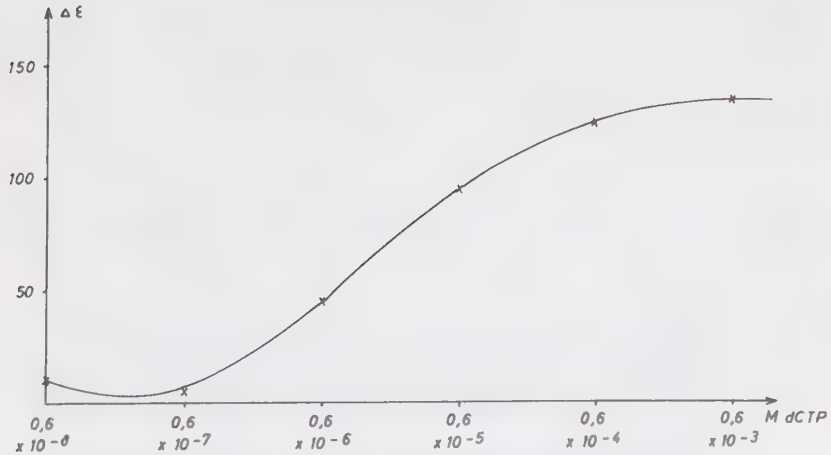


Abb. 8: Abhängigkeit der dCMP-Desaminase von der dCTP-Konzentration. Pat.: Fi.,E., CML. Eingesetzte Zellzahl: 1,25 · 10^7.

3.1.6. Einfluß von dCTP und TTP auf die dCMP-Desaminase

Die Aktivierung der dCMP-Desaminase durch dCTP wurde an peripheren Leukozyten eines Patienten mit chronischer Myelose untersucht. Abbildung 8 zeigt bei logarithmischer Darstellung der zugefügten dCMP-Konzentration einen nahezu linearen Anstieg der dCMP-Desaminase-Aktivität im Bereich von $0{,}67 \cdot 10^{-7}$ M bis $0{,}67 \cdot 10^{-4}$ M dCTP.

Abbildung 9 liegen Untersuchungen an peripheren Leukozyten eines Patienten mit akuter Myeloblasten-Leukämie zugrunde. Die obere Kurve (I) zeigt die konzentrationsabhängige Aktivierung durch dCTP in einem Ansatz ohne $MgCl_2$. In der unteren Kurve (II) ist die äquimolare Hemmung der dCMP-Desaminase durch TTP in einem Ansatz ohne $MgCl_2$ und dCTP aufgetragen.

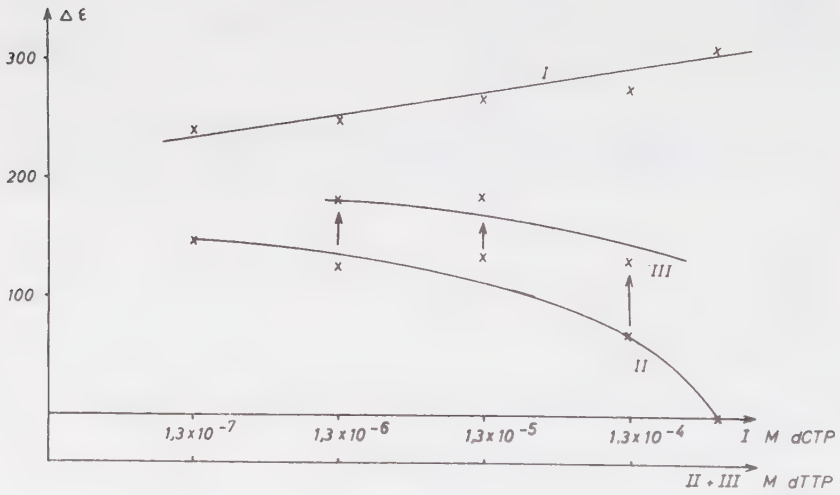


Abb. 9: Einfluß von dCTP und TTP auf die Aktivität der dCMP-Desaminase.
Kurve I: Aktivierung durch dCTP im Routine-Ansatz.
Kurve II: Hemmung durch TTP in einem Ansatz ohne dCMP, Magnesiumchlorid (Stabilisator: 0,05 M Mercaptoäthanol).
Kurve III: Teilweise Aufhebung der TTP-Hemmung in Kurve II durch Zugabe von 2 mM Magnesiumchlorid.
Pat.: Li.,I., AML. Eingesetzte Zellzahl: $1{,}35 \cdot 10^7$.

Bei einer TTP-Konzentration von $0{,}67 \cdot 10^{-4}$ M ist die dCMP-Desaminase vollständig gehemmt. In der mittleren Kurve (III) ist die teilweise Aufhebung der Enzym-Hemmung durch TTP nach Zugabe von $MgCl_2$ in einer Konzentration von 1 mM dargestellt.

In Abbildung 10 ist die Aufhebung der dCMP-Desaminase-Hemmung durch TTP durch äquimolare Mengen an dCTP dargestellt. Diese Untersuchung wurde mit dem Zytolysat peripherer Leu-

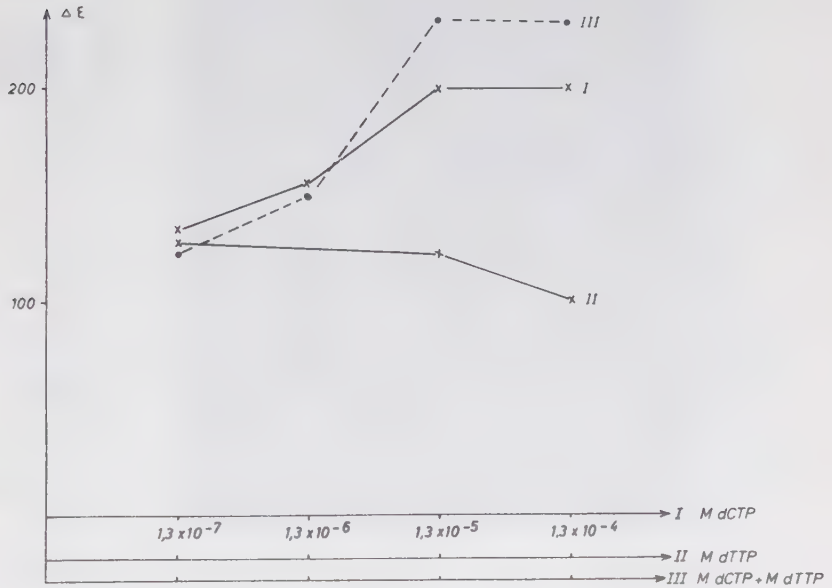


Abb. 10: Aufhebung des Hemmeffektes von TTP auf die dCMP-Desaminase durch äquimolare Konzentrationen von dCTP.
Kurve I: Konzentrationsabhängige Aktivierung durch Zugabe von dCTP zum Routine-Ansatz.
Kurve II: Hemmung durch TTP in einem Ansatz ohne $MgCl_2$, dCTP (Stabilisator: 0,05 M Mercaptoäthanol).
Kurve III: Zufügung äquimolarer Mengen an dCTP und TTP in steigender Konzentration. $MgCl_2$ wie im Routine-Ansatz. Pat.: Li.,I., AML. Eingesetzte Zellzahl: $1{,}35 \cdot 10^7$.

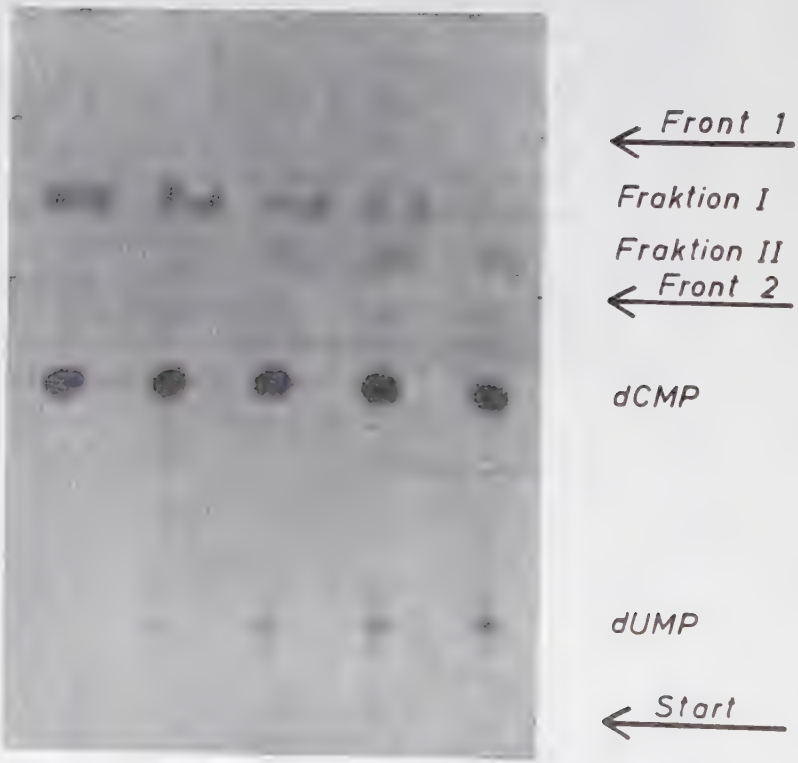


Abb. 11: Autoradiogramm einer dreistufigen Chromatographie eines nach verschiedenen Inkubationszeiten anteilweisen Enzymansatzes. Zytolysat Ge.,G., infektiöse Mononukleose. Dauer der autoradiographischen Exposition 5 Tage. Start- und Frontlinien durch Pfeile markiert.

kozyten einer Myeloblasten-Leukämie durchgeführt. Kurve (I) zeigt die konzentrationsabhängige Aktivierung durch dCTP, Kurve (II) die konzentrationsabhängige Inaktivierung durch TTP. In Kurve (III) ist die Aktivität der dCMP-Desaminase bei gleichzeitiger Zugabe äquimolarer Mengen an dCTP und TTP dargestellt. Man sieht, daß unter diesen Bedingungen die Hemmung der dCMP-Desaminase nicht nur vollständig aufgehoben wird, sondern sogar eine leichte Aktivitätssteigerung eintritt. Bei der Konzentration von 10^{-7} M dCTP und dTTP treffen sich die 3 Kurven in einem Punkt.

3.1.7. Ergebnisse der radioaktiven Testansätze

Abbildung 11 zeigt ein typisches Autoradiogramm einer dreistufigen Dünnschichtchromatographie auf PEI-Cellulose-Folie. Im Laufe der Inkubation nimmt das durch die dCMP-Desaminase gebildete dUMP zu. Die Abnahme von dCMP ist wegen der hohen Konzentration dieser Substanz im Ansatz nicht zu sehen, läßt sich aber durch Messung der ^{14}C-Aktivität im Liquid Scintillation Spectrometer nachweisen. Schon in der Nullminutenprobe wird durch den Vorlauf mit aqua bid. ein bestimmter Anteil an Nichtnukleotiden abgetrennt. Es handelt sich offenbar um eine Verunreinigung der radioaktiven ^{14}C-dCMP-Lösung mit Nukleosiden oder Basen. Dies wurde durch Chromatogramme der ^{14}C-dCMP-Lösung bestätigt. Im Laufe der Inkubation bildete sich die abgetrennte Fraktion I der Nichtnukleotide zu Gunsten einer zweiten Fraktion (II) zurück. Die von uns zur Kontrolle als reine Vergleichssubstanzen parallel chromatographierten Nukleoside und Basen (Cytosin, Uracil, Thymin, CR, UR, CdR, UdR, TdR) liefen ohne Ausnahme kurz hinter der Front des aqua bid.-Vorlaufes. Eine genauere Identifizierung der Fraktionen I und II war jedoch auf diese Weise nicht möglich.

In Tabelle 4 werden die Ergebnisse eines Enzymansatzes mit dem Zytolysat peripherer Leukozyten eines Patienten mit chronischer Myelose angeführt. Entsprechende Befunde wurden bei 5 weiteren Patienten mit verschiedenen leukämischen Erkrankungen erhoben. Die Menge der aufgetrennten

Ansatz	Inkubation min.	Gesamtaktivität cpm	Aktivitätsverteilung % der Gesamtaktivität		
			dCMP	dUMP	Frakt. I & II
mit Enzym	0	12369	82,4	1,3	16,4
	2	12201	76,5	5,5	18,0
	5	14813	72,2	10,5	17,3
	11,5	13896	67,5	16,2	16,3
	19	12292	62,6	21,2	16,1
ohne Enzym	30	11501	82,7	-	17,3

Tab. 4: Ergebnisse eines radioaktiven Testansatzes mit nachfolgender 2-stufiger Dünnschichtchromatographie. Periphere Leukozyten eines Patienten (Sp., A.) mit CML. In der Tabelle unten ein Vergleichsansatz ohne Enzym.

Substanzen wird in Prozent der Gesamt-Aktivität ausgedrückt. Es findet sich für die ^{14}C-dUMP-Bildung eine lineare Korrelation zur Dauer der Inkubationszeit. Im Leeransatz ohne Enzym ergibt sich ein Anteil von 17,3% markierter Nichtnukleotide. Bei einer weiteren Präparation radioaktiver ^{14}C-dCMP-Lösung konnten wir einen Anteil von ca. 6% feststellen. Dieser Prozentsatz an Basen und Nukleosiden bleibt über die Dauer der Inkubation in etwa konstant. Daraus ziehen wir folgende Schlüsse:

1. Während der Inkubation findet keine nennenswerte Dephosphorylierung der Nukleotide zu Nukleosiden statt.
2. Zur Errechnung der dCMP-Desaminase-Aktivität kann nicht von der eingesetzten Gesamt-Aktivität ausgegangen werden, sondern nur von dem Anteil, der tatsächlich dCMP entspricht.

3.1.8. Vergleich zwischen spektralphotometrisch und radioaktiv bestimmter dCMP-Desaminase-Aktivität

In Tabelle 5 werden die mit den radioaktiven und spektralphotometrischen Testansätzen ermittelten Enzymaktivitäten

Pat.	Diagnose	Dünnschicht-Chromatographie	Aktivität in U/10^{10} Z	
			radioaktiver Ansatz	photometrischer Ansatz
Po.,H.	Bl.Schub b.CML	2-stufig	16,7	17,0
Ru.,D.	ALL	2-stufig	3,9	1,3
Da.,D.	ALL	2-dimensional	12,8	11,2
Sp.,A.	CML	2-dimensional	9,0	9,4
Sp.,A.	CML	2-stufig	11,1	9,4
Ge.,B.	Mononukl.	2-stufig	13,0	10,6
Fi.,E.	CML	2-stufig	22,6	22,2

Tab. 5: Vergleich zwischen spektralphotometrisch und radioaktiv bestimmter dCMP-Desaminase-Aktivität

gegenübergestellt. Es zeigt sich eine hohe prozentuale Abweichung bei den niedrigsten der untersuchten Enzymaktivitäten. Abgesehen von den Ansätzen mit niedriger Enzymaktivität besteht eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des spektrophotometrischen und des radioaktiven Ansatzes.

3.2. Die dCMP-Desaminase bei Normalpersonen und Patienten mit verschiedenen leukämischen Erkrankungen

In Tabelle 6 werden Mittelwerte und Standardabweichungen der dCMP-Desaminase-Aktivität für die untersuchten Zellgruppen aufgeführt und den von WILMANNS und NEEF angegebenen Durchschnittswerten der Thymidylatsynthetase (48,53) gegenübergestellt.

3.2.1. Vergleich zwischen peripheren Leukozyten von Normalpersonen und Patienten mit Leukämien

Die durchschnittliche Aktivität der dCMP-Desaminase in normalen peripheren Leukozyten wurde durch Untersuchungen

Untersuchte Zellen	dCMP-Desaminase		Thymidylat-synthetase	
	N	$\bar{x} \pm s$ (U/10^{10}Z)	N	$\bar{x} \pm s$ (mU/10^{10}Z)
Normalpersonen:				
periphere Zellen	11	2,4 ± 2,2	9	1,3 ± 0,5
Akute Leukosen:				
a) periphere Z.	20	9,2 ± 5,9	24	6,2 ± 3,3
b) Markzellen	9	15,7 ±12,4	11	21,0 ± 7,1
Chronische Myelosen:				
periphere Zellen	5	9,2 ± 4,2	8	7,4 ± 2,9
Infektiöse Mononukleose	5	7,3 ± 3,3	-	- -

Tab. 6: Durchschnittliche dCMP-Desaminase-Aktivität mit Standard-Abweichung bei Normalpersonen ohne Leukozytose, Leukämien und infektiöser Mononukleose verglichen mit den entsprechenden Werten der Thymidylatsynthetase nach WILMANNS und NEEF (48,53) dCMP-Desaminase-Aktivität angegeben in U/10^{10} und Thymidylatsynthetase-Aktivität in mU/10^{10} Zellen.

an Leukozyten-Zytolysat von gesunden Personen ohne Leukozytose ermittelt. Zur Feststellung der Durchschnittswerte leukämischer Leukozyten wurden nur Untersuchungen vor Beginn einer zytostatischen Therapie herangezogen.

Die Aktivität der dCMP-Desaminase liegt in peripheren weißen Blutzellen bei akuter Leukämie und chronischer Myelose im Durchschnitt um das 3,9-fache höher als in normalen peripheren Leukozyten. Dieses Ergebnis ist mit $p < 0,01$ für die akuten Leukosen und mit $p < 0,02$ für die chronischen Myelosen statistisch signifikant. Allerdings liegt auch bei infektiöser Mononukleose die Umsatzgeschwindigkeit der dCMP-Desaminase um den Faktor 3,1 höher als in normalen peripheren Leukozyten.

Pat.	Diagnose	dCMP-Desaminase-Akt. $U/10^{10}$ Z		weiße Vorstufen %	
		Peripherie	Mark	Peripherie	Mark
Pe.	AML	11,8	21,2	96	-
He.	AML	12,4	25,8	68	-
Lü.	AML	17,0	21,9	66	71,5
Sp.	AML	1,5	0,8	57	83,5
La.	AML	8,9	16,7	74	-
Ei.	Ak.myelo-monoz. L	0,7	8,9	38^{+}	67^{++}
Li.	ALL	0,9	9,2	84	95
Ma.	ALL	0	3,2	71	92
Lo.	Ak.undiff.L	16,7	3,0	85,5	96
Bä.	Lympho-Sa.	9,3	20,2	76	70
Le.	Retikulo-Sa.	5,9	24,5	23	91
We.	Plasmozytom	17,9	23,0	0	4
Ko.	CML	8,6	14,5	19,5	20
Re.	CML	10,0	2,9	35	-

$^{+}$38% monozytoide

$^{++}$15% monozytoide, 52% Blasten

Tab. 7: Gegenüberstellung der Enzymaktivitäten in peripheren Zellen und Knochenmarkzellen. Der Prozentsatz an weißen Vorstufen beinhaltet Myeloblasten, Myelozyten und Promyelozyten.

3.2.2. Gegenüberstellung von peripheren Leukozyten und Knochenmarkzellen

Diese Untersuchungen wurden an behandelten und unbehandelten Patienten mit leukämischen Erkrankungen sowie einem Patienten mit Plasmozytom durchgeführt. In Tab. 7 werden die Enzymaktivitäten in peripheren Zellen und in Knochenmarkzellen miteinander verglichen. Dazu wird jeweils der Prozentsatz an weißen Vorstufen im Mark und im peripheren

Blut angegeben. Während 11 der angeführten Patienten im Knochenmark eine deutlich höhere Aktivität zeigen, weisen 2 Patienten (Lo. und Re.) eine deutlich niedrigere Aktivität auf. Beide Patienten hatten eine stark vergrößerte Milz, so daß angenommen werden kann, daß die leukämischen Leukozyten vorwiegend aus der Milz und nicht aus dem Knochenmark stammen. Bei dem Patienten Sp. liegen in peripheren Leukozyten und in Knochenmarkzellen so niedrige Enzymaktivitäten vor, daß die geringe Differenz innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmung liegt.

Bei der statistischen Berechnung der Mittelwerte der Enzymaktivitäten zeigen jedoch die Knochenmarkzellen der leukämischen Patienten eine signifikant höhere Enzymaktivität ($p<0,01$). Diese beträgt im Durchschnitt das 1,7-fache der Aktivität der peripheren leukämischen Leukozyten.

Auffällig ist, daß keine Korrelation zwischen der Höhe der dCMP-Desaminase-Aktivität und dem Prozentsatz an weißen Vorstufen berechnet werden kann.

3.2.3. Verschiedene Formen akuter Leukämien

Gliedert man die akuten Leukämien in verschiedene Formen auf, so weist die akute myeloische Leukämie gegenüber der Gruppe aller übrigen Leukosen in den peripheren Leukozyten eine um 2,7 $U/10^{10}$ Zellen höhere dCMP-Desaminase-Aktivität auf (Tabelle 8). Diese Differenz ist mit $p<0,01$ stati-

Untersuchungen	N	dCMP-Desaminase-Aktivität ($U/10^{10}$ Z) Akute myel. Leukämie	N	andere akute Leukosen
vor Therapie	13	10,5 ± 5,9	7	7,4 ± 5,9 akute Lymphoblast.L.
vor u.während Therapie	43	8,1 ± 6,7	16	4,8 ± 5,4

Tab. 8: Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$) der dCMP-Desaminase-Aktivität bei verschiedenen Formen der akuten Leukämie.

stisch signifikant. Bei Hinzunahme von Untersuchungsergebnissen unter zytostatischer Therapie erscheint diese Differenz auf den ersten Blick noch deutlicher zu werden (Tabelle 8, untere Zeile), ist jedoch wegen der großen Standard-Abweichung statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.2.4. Vergleich der Enzym-Aktivitäten von dCMP-Desaminase und Thymidylatsynthetase

In der Übersichtstabelle 6 werden die Aktivitäten der dCMP-Desaminase den von WILMANNS und NEEF angegebenen Werten für die Thymidylatsynthetase (53) gegenübergestellt. Die Thymidylatsynthetase hat eine um den Faktor 1000 niedrigere Aktivität als die dCMP-Desaminase. Es ergeben sich jedoch für beide Enzyme ähnliche Steigerungsraten von Normalpersonen zu leukämischen Patienten und von peripheren Leukozyten zu Knochenmarkzellen.

3.3. Verhalten der dCMP-Desaminase unter zytostatischer Therapie

3.3.1. Methotrexat

Das Verhalten der dCMP-Desaminase wurde während der Therapie einer akuten Lymphoblasten-Leukämie (Pat.: Kr.,D., 41 J.) mit Methotrexat und Citrovorum-Faktor untersucht, nachdem zuvor eine Therapie mit Vincristin/Hostacortin und Adriamycin nur zu einem vorübergehenden Erfolg geführt hatte. Zum Vergleich und zur Beurteilung der Stoffwechselsituation der leukämischen Zellpopulation wurden Enzymaktivitätsbestimmungen der FH_2-Reduktase und Thymidinkinase sowie die Einbauraten von ^{3}H-Thymidin hinzugezogen.

Die Patientin erhielt eine Methotrexat-Dauerinfusion (Abb. 12) von 2 mg/kg Körpergewicht über 24 Stunden. Anschließend erfolgten Gaben von 6 x 6 mg Citrovorum-Faktor (Leucovorin^R) i.v. über 36 Stunden (15,54). Die der Metho-

trexat-Infusion folgende Leucovorin-Gabe hat den Sinn, nach letaler Schädigung der leukämischen Zellpopulation durch den Folsäureantagonisten die Regeneration der normalen Zellbildung zu schützen. Unter dieser Behandlung sanken die Leukozyten von 26300/mm^3 auf 7100/mm^3, und der Anteil der Blasten im peripheren Blut verringerte sich von 91% auf 14% am 3. und 1% am 7. Behandlungstag (siehe Abbildung 12).

Methotrexat bewirkt eine spezifische Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase (3,11,46,47), die sich in einem deutli-

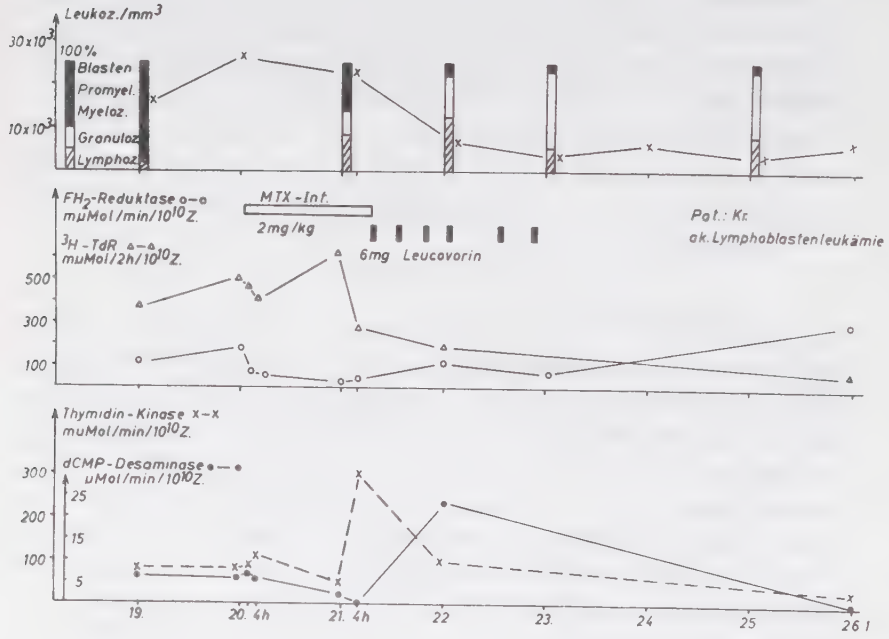


Abb. 12: Verlauf einer Lymphoblasten-Leukämie unter Methotrexat-Therapie: Veränderungen des Differentialblutbildes (oben), Verhalten der FH_2-Reduktase und der Desoxythymidin-Einbaurate (^{3}H-TdR) (Mitte), der dCMP-Desaminase und der Thymidinkinase (unten). Pat.: Kr.,D.

chen Abfall der Enzymaktivität bis zum 6. Behandlungstag zeigt.

Im Gegensatz zur FH_2-Reduktase zeigen dCMP-Desaminase, Thymidinkinase sowie Thymidin-Einbauraten unter Methotrexat in den ersten Tagen einen Anstieg auf das Mehrfache ihrer Ausgangs-Aktivität. Diese Steigerungen sind jedoch nur vorübergehend: Etwa 48 Stunden nach Therapiebeginn kommt es wieder zu einem Absinken der Enzym-Aktivitäten bei gleichzeitigem Abfall der Leukozyten-Zahl und des Blasten-Anteils im peripheren Blut. Die Ursache der Aktivitätssteigerung von dCMP-Desaminase und Thymidinkinase liegt wahrscheinlich darin, daß durch Hemmung der FH_2-Reduktase die Thymin-Methylgruppen-de-novo-Synthese gebremst wird und daher die negative Rückkopplungs-Kontrolle durch TTP wegfällt. Der nach 6 Tagen erfolgende Wiederanstieg der FH_2-Reduktase hat keinen Einfluß mehr auf den klinischen Erfolg der Behandlung (55).

3.3.2. Cytosinarabinosid

Bei einem 37-jährigen Patienten, der an einer akuten myeloischen Leukämie erkrankt war, wurde als Ersttherapie 2 x 120 mg Cytosinarabinosid pro Tag i.v. gegeben. Wie in Abb. 13 zu sehen ist, sank unter dieser Therapie innerhalb der ersten 3 Behandlungstage die Leukozytenzahl nur gering von 27700 auf 23000/mm^3 ab. Der Prozentsatz an weißen Vorstufen blieb mit ca. 80% konstant. Eine Remission konnte auch im weiteren Verlauf nicht erzielt werden.

dCMP-Desaminase und Thymidinkinase weisen unter der Therapie weitgehend ähnliche Verläufe auf. Es kommt bei beiden Enzymen zunächst zu einem Aktivitätsabfall, dem ein deutlicher Wiederanstieg über den Ausgangswert folgt. Der Wiederanstieg der dCMP-Desaminase scheint jedoch im Vergleich zu dem der Thymidinkinase verzögert zu sein, so daß die dCMP-Desaminase ihre höchste Aktivität erst 24 Stunden nach Therapiebeginn aufweist. Am 2. Behand-

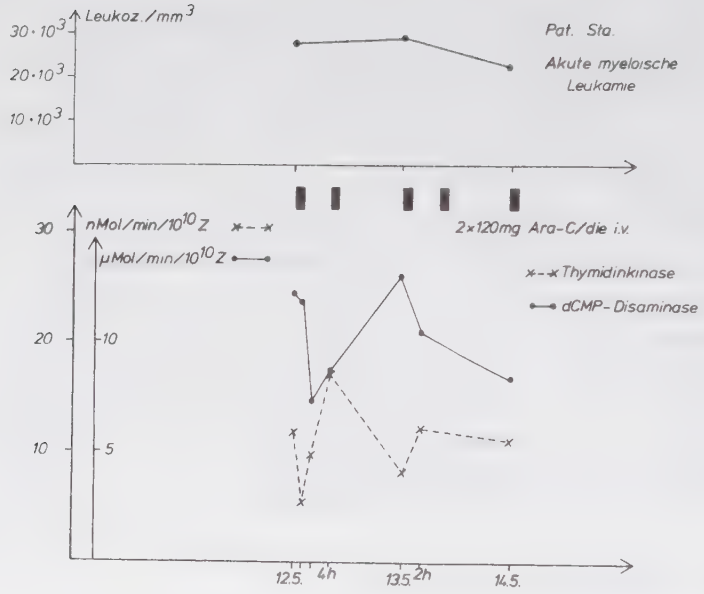


Abb. 13: Verlauf einer akuten myeloischen Leukämie unter einer Therapie mit Cytosinarabinosid.
Oben: Leukozytenzahl, unten: Verlauf von dCMP-Desaminase und Thymidinkinase.

lungstag zeigt sich ein scheinbar entgegengesetztes Verhalten der beiden Enzyme, das jedoch ebenfalls aus der verzögerten Reaktion der dCMP-Desaminase erklärbar ist.

In Tabelle 9 wird eine Übersicht über die Verlaufsbeobachtungen der Enzyme bei insgesamt 7 in dieser Weise von uns untersuchten Patienten gegeben. Bei 2 der Patienten (Sta. und Vo.) ist unter der Cytosinarabinosid-Therapie lediglich ein Aktivitätsabfall der dCMP-Desaminase zu beobachten. Bei den Patienten Bä. und Et. erfolgt nach einem Aktivitätsabfall ein deutlich erkennbarer Wiederanstieg. Bei den übrigen Patienten (Sta., La. u. Lo., s. auch Abb. 13 u. 15) ist der Aktivitätsanstieg der dCMP-Desaminase noch etwas stärker ausgeprägt. Bis auf einen Patienten (Vo.) mit entge-

	Sta. Ak.prom.L.	Vo. Ak.prom.L.	Bä. Leuk.Retik.	Et. A.myel.L.
dCMP-Des. ($U/10^{10}Z$)				
vor Ara-C	9,2	8,9	17,7	3,2
1 h n.	7,4	11,1	8,6	0,8
2 h n.	3,3	5,9	-	2,2
4 h n.	4,7	6,2	14,3	3,4
Thymidink. ($uMol/10^{10}Z/Min$)				
vor Ara-C	28,5	9,5	11,4	13,5
1 h n.	22,4	11,7	11,1	19,6
2 h n.	7,3	17,1	15,0	17,5
4 h n.	7,7	16,7	18,2	19,1

Tabelle 9: Verlaufsbeobachtung der Enzymaktivitäten der dCMP-Desaminase und Thymidinkinase vor Therapiebeginn und 1, 2 und 4 h nach Cytosinarabinosid-Gabe.

gengesetztem Verhalten von dCMP-Desaminase und Thymidinkinase weisen die beiden Enzyme unter Cytosinarabinosid-Behandlung ähnliche Verläufe auf.

3.3.3. Hydroxy-Urea

Die Untersuchung der dCMP-Desaminase unter Hydroxy-Urea-Behandlung wurde bei einem 41 Jahre alten Patienten mit akuter undifferenzierter Leukose durchgeführt. Der Patient hatte zuvor noch keine zytostatische Therapie erhalten. Mit der Gabe von 100 mg Hydroxy-Urea (HU) pro kg Körpergewicht p.o. wurde eine Synchronisation der leukämischen Zellpopulation durch Arretierung der Synthese am Übergang von der G_1- zur S-Phase angestrebt. Nach Aufhebung des Blocks tritt ein großer Teil der Zellen gleichzeitig in die S-Phase ein, in der die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Zytostatika, die die DNS-Synthese hemmen, besonders groß ist (55).

Die Werte für die HU-Konzentrationen im Blut, die Aktivität der Thymidinkinase und die Thymidin-Einbauraten wurden einer Veröffentlichung von W.WILMANNS, K.WILMS und M.F.RAJEWSKI (55) entnommen. Das Ende der Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase wird nach ca. 13 Stunden bei einer kritischen Konzentration von $1{,}4 \cdot 10^{-4}$ M HU im Blut erreicht (55). Der Wiederbeginn der DNS-Synthese wird durch den Anstieg der Thymidin-Einbaurate repräsentiert. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, kommt es während der Blockierung zu einem starken Abfall der dCMP-Desaminase. Thymidin-Einbau und Thymidinkinase zeigen den Aktivitätsrückgang erst nach vorübergehendem Anstieg. Nach der Entblockung steigen alle 3 Parameter bis zur 24. Stunde nach Beginn der HU-Gabe auf höhere Werte als vor Therapiebeginn an.

In Abbildung 15 wird der Verlauf der Enzymaktivitäten während einer zweimaligen Ara-C-Therapie nach Synchronisationsbehandlung mit Hydroxy-Urea dargestellt. Im Vergleich mit Abbildung 14 wird noch einmal das unter-

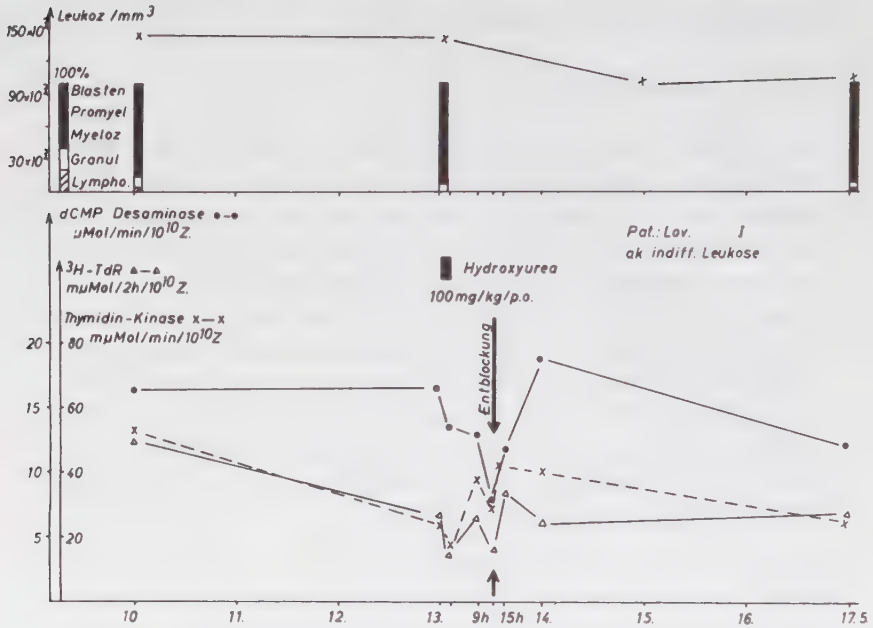


Abb. 14: Verlaufsbeobachtung bei einem Patienten mit akuter undifferenzierter Leukose unter Hydroxy-Urea-Therapie.
Oben: Verhalten der Leukozyten, unten: Verlauf der dCMP-Desaminase, der Thymidinkinase und der Thymidin-Einbaurate (^{3}H-TdR).

schiedliche Verhalten der dCMP-Desaminase unter Hydroxy-Urea und Ara-C deutlich. Während unter Ara-C-Behandlung zweimal ein gemeinsamer Aktivitätsanstieg von dCMP-Desaminase und Thymidinkinase zu sehen ist, kommt es unter Hydroxy-Urea nur zu einem Abfall der dCMP-Desaminase.

Während der ersten Hydroxy-Urea-Behandlung (Abb. 14) war lediglich ein Abfall der Leukozytenzahl von 144 000 auf 112 000/mm^3 zu verzeichnen. Gegen Ende der 2. Behand-

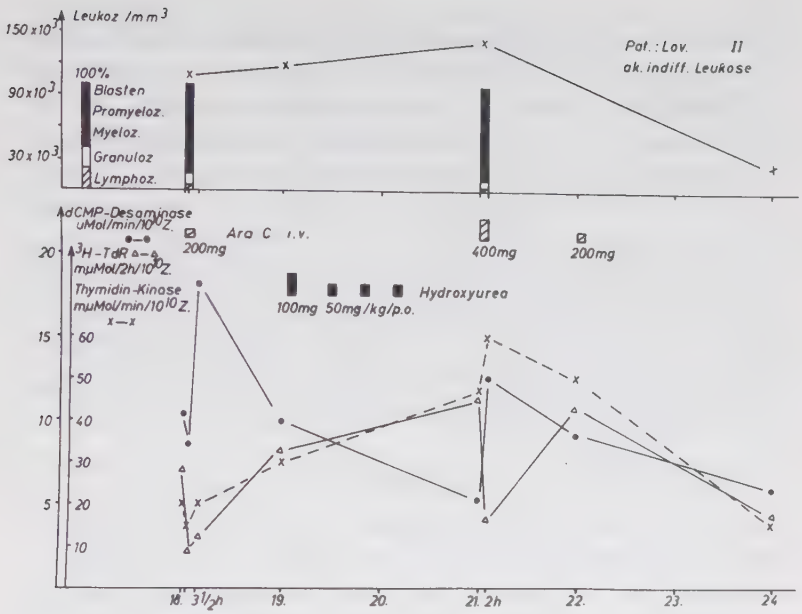


Abb. 15: Verlaufsbeobachtung bei einem Patienten mit akuter undifferenzierter Leukämie unter einer Therapie mit Hydroxy-Urea (HU) in Kombination mit Cytosinarabinosid (Ara-C).
Oben: Verhalten der Leukozyten, unten: Verlauf der dCMP-Desaminase, der Thymidinkinase und der Thymidin-Einbaurate (^{3}H-TdR).

lungsphase (Abb. 15) verringerte sich die Leukozytenzahl auf 23 000/mm^3. Der Prozentsatz der Blasten fiel hingegen nur leicht von 94% auf 81% ab.

4. DISKUSSION

Da das Produkt der dCMP-Desaminase-Reaktion - Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) - direkt in die de-novo-Synthese des DNS-Thymin eingeht, ist dieses Enzym in Hinblick auf DNS-Reduplikation und Zellteilung von Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir das Enzym in normalen und leukämischen myeloischen Zellen. Die Enzym-Aktivität wurde in Anlehnung an eine von MALEY (29) beschriebene Methode bestimmt, ergänzt durch einen radioaktiven Ansatz mit chromatographischer Trennung der Reaktionsprodukte. Da in der Literatur mehrere unterschiedliche Formen des Enzymansatzes beschrieben werden, gehen wir zunächst auf die Ansatz-Bedingungen ein.

4.1. Bedingungen der Testansätze

Um eine optimale dCMP-Desaminase-Aktivität zu erhalten, gibt es grundsätzlich 2 verschiedene Formen des Enzymansatzes: 1. den Ansatz bei hoher Substrat-Konzentration von > 2 mM, in dem die aktivierende Wirkung von dCTP nicht mehr nachweisbar ist (29), und 2. den Ansatz mit Zusatz von dCTP und $MgCl_2$, bei dem die optimale Substratkonzentration niedriger ist, da dCTP die Substrataffinität der dCMP-Desaminase erhöht. TTP vermindert entsprechend die Substrataffinität der dCMP-Desaminase (29). Der 2. Ansatz mit der geringeren Substratkonzentration scheint eher den Verhältnissen in vivo zu entsprechen (14), da er im Gegensatz zu dem ersten auch die Möglichkeit der allosterischen Aktivierung und Hemmung erlaubt. Daher wählten wir die letztgenannte Ansatzform und fanden eine optimale Substratkonzentration von 2 mM dCMP unter den in 2.4. beschriebenen Ansatzbedingungen.

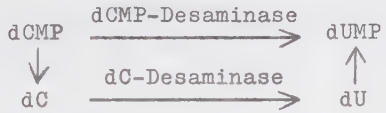
Die pH-Optima der dCMP-Desaminase unterscheiden sich je nach Herkunft der Enzym-Präparation (25). Auch die Substratkonzentration und die Art des Puffers beeinflussen die pH-Abhängigkeit des Enzyms (29). Durch die dCTP- und

TTP-Konzentration wird ebenfalls das pH-Optimum verändert (24).

SILBER fand für die Leukozyten-dCMP-Desaminase ein breites pH-Optimum bei pH 8. Bei Anwesenheit von dCTP bildete sich eine Schulter der Kurve zum alkalischen pH hin (42). Wir erhielten unter unseren Versuchsbedingungen entsprechend dem Zusatz von dCTP für die Leukozyten-dCMP-Desaminase eine zweigipflige pH-Abhängigkeitskurve (siehe Abbildung 5).

Im spektrophotometrischen Testansatz wird die Abnahme von dCMP als Extinktionsabnahme bei λ = 290 nm gemessen. Um zu klären, ob der Abnahme von dCMP tatsächlich eine Zunahme der dUMP-Konzentration entspricht und nicht ein anderes Reaktionsprodukt entsteht, führten wir im Anschluß an den ^{14}C-dCMP-Enzymansatz eine chromatographische Trennung der Reaktionsprodukte durch. Bei Messung der durch reine Vergleichssubstanzen identifizierten ^{14}C-dUMP-Flecke ergab sich eine lineare Zunahme von ^{14}C-dUMP während der Inkubation, die der Abnahme der dCMP-Konzentration entsprach. Die Übereinstimmung der Ergebnisse des radioaktiven und des spektralphotometrischen Testansatzes war befriedigend (siehe Tab. 4 und Kap. 3.1.8.).

Es blieb jedoch die Frage, ob die Ergebnisse nicht durch das Vorhandensein einer aktiven dC-Desaminase gestört würden, entsprechend folgender Skizze:



Da bei gleichbleibender Menge an Nukleosiden und Basen (siehe Tab. 4) bei diesem Umweg ein Gleichgewicht zwischen Abbau von dCMP zu dC und Rephosphorylierung von dU zu dUMP bestehen müßte, wird diese Möglichkeit sehr unwahrscheinlich. Denn die Umwandlung von dU zu dUMP wird durch die Thymidinkinase katalysiert (30,37), die eine wesentlich niedrigere Enzymaktivität als die dCMP-Desaminase hat und

zudem einen Energielieferanten in Form von ATP benötigt.

SILBER stellte bei Untersuchungen an Leukozyten-Zytolysat keine Dephosphorylierung von dCMP zu dC fest, so daß er diese Möglichkeit ebenfalls ausschloß (42).

4.2. Aktivatoren und Inhibitoren der dCMP-Desaminase und ihre Bedeutung für den Nukleotidstoffwechsel

Die dCMP-Desaminase unterliegt einer allosterischen Aktivierung durch dCTP und allosterischen Hemmung durch TTP (27,41). Diese Hemmung und Aktivierung sind hochspezifisch: dCDP und TDP können die Triphosphate in ihrer Wirkung nicht ersetzen, und auch die Triphosphatnukleotide der übrigen Basen zeigen nicht dieselbe Wirksamkeit wie dCTP oder TTP (23,29). Eine Ausnahme bilden dUTP und Jod-dUTP, die eine ebenso starke Hemmwirkung haben wie TTP (23).

Als isosterische, kompetitive Inhibitoren sind dUMP, dGMP und TMP bekannt. Ihre Wirksamkeit ist aber um den Faktor 20 geringer als diejenige von TTP (29,27).

Für die Leukozyten-dCMP-Desaminase konnten wir in Übereinstimmung mit SILBER (42) eine Hemmung bzw. Aktivierung mit dCTP bzw. TTP nachweisen. Es ergab sich eine sigmoidale dCTP-Abhängigkeitskurve der Enzymaktivität (siehe Abb. 8), die auf den allosterischen Angriffspunkt des Aktivators hinweist. Gleichzeitig ist diese Form der dCTP-Abhängigkeit ein Hinweis darauf, daß eine Interaktion mit TTP stattfindet, TTP also im Zytolysat vorhanden sein muß (31).

Wie von MALEY et al. (25) für die aus E.coli isolierte dCMP-Desaminase beschrieben wurde, heben auch bei dem Leukozyten-Enzym gleiche Mengen an dCTP die TTP-Hemmung wieder auf (siehe Abb. 10). Daß $MgCl_2$ für die Stabilisierung und Aktivierung durch dCTP notwendig ist, wurde für verschiedene Enzympräparationen bekannt (18,29,14,25). SILBER fand bei seinem teilgereinigten Leukozytenenzym keine Ver-

stärkung der dCTP-Wirkung durch $MgCl_2$ (42). Auch wir konnten die unterstützende $MgCl_2$-Wirkung nicht in allen Zytolysaten und, falls vorhanden, nur in geringem Ausmaß nachweisen. Da nach Na_2EDTA-Zugabe jedoch regelmäßig ein deutlicher Enzymaktivitäts-Abfall eintrat, kann daraus geschlossen werden, daß im Zytolysat oder/und in den zum Ansatz hinzugefügten Lösungen schon ohne Zugabe von $MgCl_2$ Magnesium-Ionen oder andere 2-wertige Ionen, die Mg^{++} ersetzen können (29), vorhanden sind.

Diese in vitro untersuchten Aktivierungs- und Hemmvorgänge scheinen auch in vivo für den Nukleotidstoffwechsel von Bedeutung zu sein. Die niedrigen Konzentrationen, bei denen dCTP und TTP wirksam werden (siehe Kap. 3.1.6.), machen es wahrscheinlich, daß auch unter physiologischen Bedingungen derartige Konzentrationen intrazellulär erreicht werden. Wie weiter unten im Kapitel 4.4. erläutert, lassen sich die Aktivitätsveränderungen der dCMP-Desaminase unter zytostatischer Therapie vielfach durch derartige Mechanismen erklären. In Anbetracht dieser Tatsachen kommt der dCMP-Desaminase eine Art Verteilerfunktion für den Pyrimidin-Nukleotid-Stoffwechsel zu. Bei hohem Angebot an dCTP und geringer TTP-Konzentration wird die dCMP-Desaminase-Reaktion beschleunigt und dadurch vermehrt dUMP produziert, das über die Thymidylatsynthetase-Reaktion zu TMP methyliert wird. Ist jedoch das Angebot an TTP höher als das von dCTP, führt die Hemmung der dCMP-Desaminase zunächst zu einer Anhäufung von dCMP, das dann je nach Reaktionslage (34) über Kinasen zu dCTP aufgebaut oder durch Phosphorylasen abgebaut wird (s. Abb. 1).

Der sog. salvage pathway zum DNS-Thymin über die Thymidinkinase-Reaktion unterliegt einer negativen Rückkopplungskontrolle durch TTP. Für die an der de-novo-Synthese von DNS-Thymin unmittelbar beteiligten Enzyme ist keine Regulation durch TTP bekannt. Auch TMP spielt als kompetitiver Inhibitor der Thymidylatsynthetase unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich keine Rolle (32). Daher erscheint es besonders sinnvoll, daß die Reaktionen, die der Thymidylatsynthetase-Reaktion vorgeschaltet sind, die Desaminie-

rung von dCMP zu dUMP und die Phosphorylierung von dU zu dUMP durch negative Rückkopplungskontrolle beeinflußt werden.

4.3. Bedeutung der dCMP-Desaminase für die Zellproliferation

Wie in Abb. 1 dargestellt, wird dUMP, das Produkt der dCMP-Desaminase, über die Thymidylatsynthetase-Reaktion direkt in den Thymidin-Stoffwechsel eingeführt. Allerdings kann dUMP auch aus UMP gebildet werden, sowie aus UdR über die Thymidinkinase (34,37). Diese weist jedoch eine um ca. 3 Zehnerpotenzen niedrigere Aktivität als die dCMP-Desaminase auf.

Von den Enzymen, die an der Thyminmethylgruppen-de-novo-Synthese beteiligt sind, stellt die Thymidylatsynthetase das Enzym dar, das die Umsatzgeschwindigkeit dieses Syntheseweges beschränkt. FH_2-Reduktase (43) und dCMP-Desaminase (siehe Tab. 6) haben um ein bzw. drei Zehnerpotenzen höhere Enzymaktivitäten. Unter starker negativer Rückkopplungskontrolle durch TTP könnte jedoch die dCMP-Desaminase in ihrer Aktivität stark abfallen und selbst zum sog. geschwindigkeitsbegrenzenden Enzym werden (42).

Von verschiedenen Autoren wurde eine Steigerung der dCMP-Desaminase-Aktivität bei Umwandlung langsam proliferierender Gewebe in Gewebe mit hoher Mitoserate beobachtet (15,21,25) und zum Teil eine Neuinduktion des Enzyms bewiesen (19). An synchronisierten HeLa-Zellen wiesen GELBARD et al. (13) die höchste dCMP-Desaminaseaktivität kurz nach dem Maximum der DNS-Synthese nach. Diese Ergebnisse weisen auf die Bedeutung der dCMP-Desaminase während der sog. log-Phase der DNS-Reduplikation und Zellproliferation hin.

Obwohl die dCMP-Desaminase auch in ausgesprochen langsam proliferierenden Geweben höhere Aktivitäten erreichen kann (22,29), scheint für myeloische Zellen ein deutlicher Zusammenhang zwischen Proliferationsgeschwindigkeit und

Höhe der Enzymaktivität gegeben zu sein (siehe Tab. 6). So konnten wir im Knochenmark von leukämischen Patienten eine signifikant höhere dCMP-Desaminaseaktivität nachweisen als in ihren peripheren myeloischen Zellen ($p < 0,01$). Während SILBER in vergleichenden Untersuchungen an leukämischen Patienten und Normalpersonen kein unterschiedliches Aktivitätsniveau fand (43), stellten wir bei der leukämischen Zellpopulation eine signifikant höhere Enzymaktivität fest ($p < 0,01$).

Obwohl bei leukämischen Patienten im Knochenmark und im peripheren Blut häufig ein gleich hoher Prozentsatz an Blasten zu beobachten ist, konnten wir für die dCMP-Desaminase im Mark signifikant höhere Enzymaktivitäten nachweisen (siehe Tab. 6 u. 7). Entsprechende Ergebnisse wurden für die Thymidylatssynthetase (53), die Thymidinkinase (54) und für die ^{3}H-TdR-Einbauraten (17) beschrieben. In Übereinstimmung mit KILLMANN (17) ist daher anzunehmen, daß sich die Blastenpopulation bei akuten Leukämien aus proliferierenden vorwiegend im Mark befindlichen Zellen und nicht proliferierenden vorwiegend in das periphere Blut eingeschleusten Zellen zusammensetzt. Demnach hinge die Höhe der erwähnten Enzymaktivitäten vom Verhältnis der teilungsfähigen zu den nicht mehr teilungsfähigen Blasten im Knochenmark und im peripheren Blut ab, zwischen denen man morphologisch nicht unterscheiden kann.

Als Beispiel für eine beschleunigte Zellneubildung bei einer nichtleukämischen Erkrankung weisen bei infektiöser Mononukleose die mononukleären Zellen im peripheren Blut ebenfalls eine deutlich höhere Enzymaktivität auf als bei gesunden Normalpersonen (vergl. Tab. 6).

Der starke Aktivitätsanstieg der dCMP-Desaminase nach Aufhebung des DNS-Syntheseblocks unter Hydroxy-Urea (siehe Abb. 12) gleichzeitig mit dem Aktivitätsanstieg der Thymidinkinase und dem vermehrten Einbau von ^{3}H-TdR in die DNS spricht ebenfalls für die enge Verbindung des Enzyms mit der DNS-Synthese. Ob es sich bei dieser Steigerung um eine

Neuproduktion des Enzyms oder einen andersartigen Mechanismus handelt, können wir anhand unserer Versuchsergebnisse nicht entscheiden.

4.4. Das Verhalten der dCMP-Desaminase unter zytostatischer Therapie im Vergleich zu Thymidylatsynthetase, Thymidinkinase und Dihydrofolatreduktase

Enzymchemische Untersuchungen bei leukämischen Patienten während einer zytostatischen Therapie dienen dazu, die Wirksamkeit der eingesetzten Zytostatika zu überprüfen. Auf diese Weise ist man dazu in der Lage, die Dosierung der Medikamente individuell zu regulieren. Bei mangelnder Sensibilität oder Resistenzentwicklung der leukämischen Zellpopulation hat man die Möglichkeit, das Medikament frühzeitig auszutauschen oder ggf. die Therapie abzubrechen, um dem Patienten unnötige Nebenwirkungen zu ersparen.

Zur Deutung der enzymchemischen Befunde ist weniger ein einmalig festgestellter Absolutwert entscheidend. Es ist vielmehr notwendig, den Aktivitätsverlauf mehrerer Enzyme in Zusammenhang mit klinischen und hämatologischen Befunden zu beurteilen.

Wie in Absatz 4.3. erläutert wurde, ist anzunehmen, daß die dCMP-Desaminase wie die Thymidinkinase, Thymidylatsynthetase und FH_2-Reduktase zu den sog. log-Phasen-Enzymen gehört, die für Zellteilungsvorgänge von großer Bedeutung sind. Sie werden in aktiv proliferierenden Zellen während der DNS-Synthese oder kurz davor neugebildet. Diese Phase des Zellzyklus ist der Angriffspunkt der meisten Zytostatika. Es lag daher nahe, das Verhalten der dCMP-Desaminase mit dem der anderen Enzyme unter zytostatischer Therapie zu vergleichen.

Im folgenden werden wir anhand der Abbildungen 11 - 14 die Aktivitätsveränderungen der oben genannten Enzyme unter Methotrexat- und Cytosinarabinosid-Therapie sowie kombinierter Hydroxy-Urea / Cytosinarabinosid-Benandlung erläutern.

Amethopterin (Methotrexat^{R}) führt als Folsäureantagonist zu einer kompetitiven pseudoirreversiblen Hemmung der FH_2-Reduktase (1,46,52). Da die Thymidylatsynthetase - Reaktion von einer ausreichenden Menge an N5,N10-Methylen-FH_4 und damit von der Konzentration an FH_4 in der Zelle abhängig ist (Abb. 1), wird durch Methotrexat die de-novo-Synthese der Thyminmethylgruppen insgesamt blockiert.

Wie in Abb. 12 dargestellt, kommt es unter Methotrexat zu einem deutlichen Abfall der FH_2-Reduktase. Andererseits zeigen Thymidinkinase und dCMP-Desaminase nach vorübergehendem Absinken der Enzymaktivitäten einen Aktivitätsanstieg. Entsprechend der Aktivitätssteigerung der Thymidinkinase findet man auch einen Anstieg der ^{3}H-TdR-Einbauraten in die DNS. Der gemeinsame Anstieg von Thymidinkinase und dCMP-Desaminase erklärt sich aus dem Rückgang der negativen Rückkopplungskontrolle durch TTP, das nicht mehr ausreichend über den de-novo-Syntheseweg gebildet wird (Abb. 1). Die gesteigerte dCMP-Desaminase-Aktivität führt zwar zu einer vermehrten Bildung von dUMP. Dieses erhöhte Substratangebot an die Thymidylatsynthetase kann aber solange nicht zur Synthese von TMP genutzt werden, wie eine wirksame Blockierung der FH_2-Reduktase durch Methotrexat aufrecht erhalten wird und damit ein Mangel an N5,N10-Methylen-FH_4 besteht. Die Thymidinkinase bildet dagegen den sog. salvage pathway, der unter Umgehung der de-novo-Synthese von Thyminmethylgruppen die Bildung von Thymidylat aufrecht erhalten kann (52). Die erhöhte Thymidinkinase-Aktivität kann also zur Resistenzentwicklung der leukämischen Zellpopulation gegen Methotrexat führen. Bei unserem Patienten (siehe Abb. 11) war jedoch der Aktivitätsanstieg der Thymidinkinase nur vorübergehend, so daß mit dieser Komplikation nicht gerechnet werden mußte.

Eine weitere Möglichkeit der Resistenzentwicklung wäre bei einem Wiederanstieg der FH_2-Reduktase innerhalb der ersten 3 Tage nach Therapiebeginn gegeben (54). Tritt er jedoch erst wie bei unserem Patienten am 6. Tag ein, ist

mit einer Resistenzbildung nicht mehr zu rechnen.

LABOW et al. (19) untersuchten die Wirkung von Methotrexat auf die dCMP-Desaminase in regenerierender Rattenleber nach partieller Hepatektomie. Sie konnten nachweisen, daß unter der zytostatischen Behandlung der sonst erfolgende Aktivitätsanstieg der dCMP-Desaminase ausblieb. Ein initialer Anstieg des Enzyms wurde von ihnen nicht beschrieben. Dies hängt wohl am ehesten mit der von ihnen verabreichten extrem hohen Dosis an Methotrexat zusammen, die das 2-tausendfache der während einer Methotrexat-Therapie beim Menschen verabreichten Dosis beträgt.

Cytosinarabinosid (1ß-D-Arabinofuranosylcytosin, Alexan^{R}) ist ein Antimetabolit, der nach Phosphorylierung zum Di- und Triphosphat die DNS-Polymerase (10) und die Reduktion von CDP zur Desoxyverbindung hemmt (6). Die dCMP-Desaminase wird durch Cytosinarabinosid (Ara-C) nicht gehemmt (18).

Ähnlich wie unter der Methotrexatbehandlung konnten wir bei Ara-C-Therapie häufig einen gemeinsamen Anstieg der Thymidinkinase und der dCMP-Desaminase nach initialem Aktivitätsabfall feststellen (vergl. Abb. 13 und 15). KIT et al. (18) beschreiben den gemeinsamen Anstieg von dCMP-Desaminase und Thymidinkinase nach Ara-C an Säugetierzellkulturen. Der gemeinsame Aktivitätsanstieg der beiden Enzyme läßt sich wiederum durch den Rückgang der negativen Rückkopplungskontrolle durch TTP erklären. Das Absinken der TTP-Konzentration soll durch die Hemmung der Cytidindiphosphatreduktase zustandekommen. Andererseits wird durch die Hemmung der CDP-Reduktase auch die dCTP-Synthese eingeschränkt, so daß für die dCMP-Desaminase die aktivierende Wirkung von dCTP gleichfalls rückläufig wäre. Dieses könnte eine Erklärung sein für die Unterschiede, die wir bei manchen Patienten unter der Cytosinarabinosid-Therapie zwischen dem Verlauf der dCMP-Desaminase und Thymidinkinase festgestellt haben.

Die Bedeutung der CDP-Reduktase-Hemmung durch Ara-C ist jedoch noch umstritten. Der dennoch häufig nachgewiesene gleichzeitige Aktivitätsanstieg von dCMP-Desaminase und Thymidinkinyse kann auf zweierlei Weise erklärt werden:

1. ist es möglich, daß der dCTP-Pool in Leukozyten größer ist als der der übrigen Triphosphate entsprechend Ergebnissen an Mäuseembryo-Zellkulturen von SKOOG u. Mitarb. (44);
2. kann eine partielle Synchronisation am Übergang von der G_1- zur S-Phase eine Rolle spielen (54), die aufgrund der Hemmung der DNS-Polymerase durch Ara-CTP zustande kommt.

Auf jeden Fall ist der Anstieg der dCMP-Desaminase unter Ara-C wie unter Methotrexat-Therapie nicht als ein Zeichen des Nachlassens der DNS-Synthesehemmung aufzufassen, sondern umgekehrt als Zeichen für das Ansprechen der leukämischen Zellen auf das Zytostatikum.

Hydroxyharnstoff (Hydroxyurea, Litalir^R) ist ein reversibler Inhibitor der DNS-Synthese. Wahrscheinlich über eine Hemmung der Ribonukleosiddiphosphat-Reduktase kommt es zu einer Arretierung der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus (55). Wird die Hemmung bei Absinken der Hydroxyurea-Konzentration aufgehoben, befindet sich ein hoher Prozentsatz der Zellen in der DNS-Synthese-Phase, in der eine besonders hohe Wirksamkeit der S-Phasen-spezifischen Antimetabolite, z.B. des Cytosinarabinosid, vorliegt (55).

Wie in Abb. 14 zu sehen ist, unterscheidet sich der Verlauf der dCMP-Desaminase-Aktivität von dem der Thymidinkinase: Diese zeigt unter Hydroxyurea- wie unter Ara-C-Behandlung einen vorübergehenden Aktivitätsanstieg, während die dCMP-Desaminase hier nur einen Aktivitätsabfall erkennen läßt. In Untersuchungen an Mäuseembryo-Zellkulturen stellten SKOOG und NORDENSKJOELD (44) unter Hydroxyurea entsprechend der Hemmung der Ribonukleotiddiphosphat-Reduktase eine Abnahme der dCTP- und dATP-Konzentration

fest, andererseits jedoch eine Zunahme der dCTP- und TTP-Konzentration. Dabei stieg die Konzentration an TTP stärker an als die von dCTP. Das von uns beobachtete Verhalten der dCMP-Desaminase ließe sich durch diese veränderte Relation von TTP zu dCTP erklären. Da die Thymidinkinase jedoch, obwohl sie ebenfalls durch TTP gehemmt wird, ein abweichendes Verhalten zeigt, ist anzunehmen, daß noch weitere unbekannte Mechanismen eine Rolle spielen. Zu diskutieren wäre eine weiter ablaufende Bildung von RNS und Thymidinkinase-Enzymprotein bei Hemmung der DNS-Synthese.

Im Gegensatz zu unserer Beobachtung beschrieben GELBARD et al. (13) bei einem vollständigen DNS-Syntheseblock unter Hydroxyurea an synchronisierten Populationen von HeLa-Zellen einen Anstieg der dCMP-Desaminase. Dieses unterschiedliche Verhalten ist möglicherweise auf die unterschiedlichen Bedingungen zwischen Zellkultur in vitro und Beeinflussung des Zellwachstums im lebenden Organismus zurückzuführen.

Der Abfall der dCMP-Desaminase und ihr abweichendes Verhalten von der Thymidinkinase lassen sich noch nicht restlos deuten. Der Wiederanstieg der dCMP-Desaminase und Thymidinkinase hingegen ist in Zusammenhang mit den erhöhten Einbauraten in die DNS sicher als Zeichen für die neue Proliferationsaktivität der Zellen aufzufassen.

Zum Verhalten der dCMP-Desaminase unter Therapie mit den o.g. Zytostatika läßt sich folgendes festhalten:
Während unter der Behandlung mit Methotrexat sowie häufig auch bei Ara-C-Therapie der initiale Anstieg der dCMP-Desaminase dem der Thymidinkinase parallel läuft und als zusätzlicher Parameter für das Ansprechen der leukämischen Zellpopulation auf die Zytostatika gedeutet werden kann, ist das Verhalten unter Hydroxyurea-Behandlung unterschiedlich zu dem der Thymidinkinase. Der Wiederanstieg beider Enzyme nach Rückgang der Hydroxyurea-Konzentration weist auf die Beendigung des DNS-Syntheseblocks und auf die Bedeutung hin, die der dCMP-Desaminase in dieser Phase des Zellzyklus zukommt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die dCMP-Desaminase wandelt dCMP zu dUMP um, das über die Thymidylatsynthetase direkt in die Thymidylat-de-novo-Synthese eingeschleust wird. Sie ist damit eng mit der DNS-Synthese verbunden.

Es wurden die optimalen Bedingungen für die Enzymaktivitäts-Bestimmungen untersucht und die Ergebnisse der spektralphotometrischen Bestimmungsmethode durch einen radioaktiven Enzymansatz mit ^{14}C-dCMP mit folgender dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Reaktionsprodukte kontrolliert.

In vitro-Untersuchungen bestätigten die aus der Literatur (27,41) bekannte allosterische Aktivierung durch dCTP und Hemmung der dCMP-Desaminase durch TTP.

In stärker proliferierenden Zellen wurde eine statistisch signifikant höhere dCMP-Desaminase gefunden.

In der Relation der Enzymaktivitäten der einzelnen Zellgruppen zueinander verhält sich die dCMP-Desaminase ähnlich wie die Thymidylatsynthetase, obwohl diese eine um ca. drei Zehnerpotenzen niedrigere Ausgangsaktivität hat.

Das Verhalten der dCMP-Desaminase in leukämischen Leukozyten wurde unter zytostatischer Therapie mit Ara-C, Methotrexat und Hydroxyurea untersucht. Dabei stellte sich ein in vielen Fällen gleichartiges Verhalten von dCMP-Desaminase und Thymidinkinase unter Ara-C- und Methotrexat-Behandlung heraus, das durch die gemeinsame negative Rückkopplungskontrolle durch TTP erklärt werden konnte. Unter Hydroxyurea-Therapie wiesen dCMP-Desaminase und Thymidinkinase einen unterschiedlichen Verlauf auf.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. BERTINO,J.R.: The mechanism of action of folate antagonists in man. Cancer Res. 23, 1286-1306 (1963)

2. BERTINO,J.R., D.M.DONOHUE, and B.W.GABRIO: The induction of dihydrofolic reductase activity in leucocytes and erythrocytes of patients treated with amethopterin. J.clin.Invest. 42, 466-475 (1963)

3. BERTINO,J.R., B.W.GABRIO, and F.M.HUENNEKENS: Dihydrofolic acid reductase in human leucocytes. Biochem.Biophys.Res.Commun. 3,461-465 (1960)

4. BERTINO,J.R., R.SILBER, M.FREEMAN, A.ALENTY, M.ALBRECHT, B.W.GABRIO, and F.M.HUENNEKENS: Studies on normal and leukemic leukocytes IV: Tetrahydrofolate dependent enzyme systems and dihydrofolic reductase. J.clin.Invest. 42, 1899-1907 (1963)

5. CAMPBELL,R.C.: Statistische Methoden für Biologie und Medizin. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1971)

6. CHU,M.Y., and G.A.FISCHER: A proposed mechanism of action of 1-ß-D-arabinofuranosylcytosine as an inhibitor of the growth of leukemia cells. Biochem.Pharmacol. 11,423-430 (1962)

7. DOCUMENTA GEIGY: Wissenschaftliche Tabellen, S. 28-131 und 146-197. Basel 1968

8. FIALA,S., and A.E.FIALA: Deoxycytidylic acid deaminase in Ehrlich ascites tumor cells. Cancer Res. 25, 922-932 (1965)

9. FRIEDKIN,M.: Assay of thymidylate synthetase activity, in: S.P.COLOWICK and N.O.CAPLAN (eds): Methods in enzymology, Vol.VI, 124-133. New York, Academic Press 1963

10. FURTH,J.J., and S.S.COHEN: Inhibition of the mammalian DNS-Polymerase by the 5'triphosphate of 1-ß-D-arabinofuranosylcytosine and the 5'triphosphate of 9-ß-D-arabinofuranosyladenine. Cancer Res. 28, 2061-2067 (1968)

11. FUTTERMANN,S.: Enzymatic reduction of folic acid and dihydrofolic acid to tetrahydrofolic acid.
J.biol.Chem. 228, 1031-1038 (1957)

12. FUTTERMANN,S., and M.SILVERMAN: The "Inactivation" of Folic Acid by Liver.
J.biol.Chem. 224, 31-40 (1957)

13. GELBARD,A.S., J.H.KIM, and A.G.PEREZ: Fluctuation in desoxycytidine monophosphate desaminase during the cell cycle in synchronous populations of HeLa cells.
Biochim.Biophys.Acta 6, 564-566 (1969)

14. GERACI,G., M.ROSSI, and E.SCARANO: Deoxycytidylate aminohydrolase, I: Preparation and properties of the homogenious enzyme.
Biochemistry 6, 183-191 (1967)

15. HRYNIUK,W.M., and J.R.BERTINO: Treatment of leukemia with large doses of methotrexate and folinic acid: Clinical-biochemical correlates.
J.clin.Invest. 48, 2140-2155 (1969)

16. KECK,K., H.R.MAHLER, and D.FRASER: Synthesis of deoxycytidine-5'-phosphate deaminase in escherichia coli infected by T2-bacteriophage.
Arch.Biochem.Biophys. 86, 85-88 (1960)

17. KILLMANN, S.A.: Proliferative activity of blast cells in leucemia and myelofibrosis.
Acta med.scand. 178, 263-280 (1965)

18. KIT,S., R.A. de TORRES, and D.R.DUBBS: Arabinofuranosylcytosine induced stimulation of thymidine kinase and deoxycytidylic deaminase activities of mammalian cultures.
Cancer Res. 26, 1859-1866 (1966)

19. LABOW,R., G.F.MALEY, and F.MALEY: The effect of methotrexate on enzymes induced following partial hepatectomy.
Cancer Res. 29, 366-372 (1969)

20. LINEWEAVER,J.R., and D.BURK: The determination of enzyme dissociation constants.
J.Am.Chem.Soc. 56, 658-668 (1934)

21. MALEY,F., and G.F.MALEY: Nucleotide interconversions, II: Elevation of deoxycytidylate deaminase and thymidylate synthetase in regenerating rat liver.
J.biol.Chem. 235, 2968 (1960)

22. MALEY,F., and G.F.MALEY: Nucleotide interconversions, IV: Activities of deoxycytidylate deaminase and thymidylate synthetase in normal rat liver and hepatomas. Cancer Res. 21, 1421-1426 (1961)

23. MALEY,F., and G.F.MALEY: On the nature of a sparing effect by thymidine on the utilization of deoxycytidine. Biochemistry 1, 847-851 (1962)

24. MALEY,F., and G.F.MALEY: On the mechanism of feedback inhibition of deoxycytidylate deaminase by deoxythymidine triphosphate. J.biol.Chem. 240, 3226-3227 (1965)

25. MALEY,G.F., D.U.GUARINO, and F.MALEY: End product regulation of bacteriophage T2 r^+ - induced deoxycytidylate deaminase. J.biol.Chem. 242, 3517-3524 (1967)

26. MALEY,G.F., and F.MALEY: Nucleotide interconversions in embryonic and neoplastic tissues, I: The conversion of deoxycytidylic acid to deoxyuridylic acid and thymidylic acid. J.biol.Chem. 234, 2975-2980 (1959)

27. MALEY,G.F., and F.MALEY: Nucleotide interconversions, IX: The regulatory influence of deoxycytidine 5'-triphosphate and deoxythymidine 5'-triphosphate on deoxycytidylate deaminase. J.biol.Chem. 237, 3311-3312 (1962)

28. MALEY,G.F., and F.MALEY: The feedback control of purified deoxycytidylate deaminase. Science 141, 1278 (1963)

29. MALEY,G.F., and F.MALEY: The purification and properties of deoxycytidylate deaminase from chick embryo extracts. J.biol.Chem. 239, 1168-1176 (1964)

30. MAYFIELD,E.D., R.A.LIEBELT, and E.BRESNIK: Activities of enzymes of deoxyribonucleic acid synthesis after unilateral nephrectomy. Cancer Res. 27, 1652-1657 (1967)

31. MONOD,J., J.WYMAN, and J.P.CHANGEUX: On the nature of allosteric transitions: A plausible model. J.mol.Biol. 12, 88-118 (1965)

32. NEEF,V.: Bestimmung, Eigenschaften und Hemmung der Thymidylat-Synthetase in normalen und pathologischen, insbesondere leukämischen myeloischen Zellen. Inaugural-Dissertation Tübingen 1970

33. O'BRIEN, J.C.: The role of the folate coenzymes in cellular division. A review. Cancer Res. 22, 267-281 (1962)

34. RABINOWITZ,Y., R.FARMER, and V.CZEBOTAR: Deoxycytidine pathway in separated normal and leukemic leukocytes with effects of cell culture. Blood 38, 312-324 (1971)

35. RAJEWSKI,M.F., und A.GRÜNEISEN: unveröffentlichte Ergebnisse.

36. RANDERATH,K.: Dünnschichtchromatographie, S.238-241. Verlag Chemie/Weinheim, 2.Aufl. 1969

37. ROBERTS,D.W., and T.C.HALL: Enzyme activities and deoxynucleoside utilization of leukemic leukocytes in relation to drug therapy and resistance. Cancer Res. 29, 166-173 (1969)

38. ROBERTS,D.W., T.C.HALL, and D.ROSENTHAL: Coordinated changes in leukemic patterns: The effect of cytosine arabinoside and methotrexate on leukocytes from patients with acute granulocytic leukemia. Cancer Res. 29, 571-578 (1969)

39. SCARANO,E.: 5'-Deoxycytidylic acid deaminase: Enzymic production of 5'-deoxyuridylic acid. Biochim.Biophys.Acta 29,459-460 (1958)

40. SCARANO,E., L.BONADUCE, and B. de PETROCELLIS: Purification and properties of the 5'-deoxycytidylic acid deaminase. J.biol.Chem. 237, 3742-3751 (1962)

41. SCARANO,E., G.GERACI, A.POLZELLA, and E.CAMPANILE: The enzymatic aminohydrolysis of 4-amino-pyrimidine deoxyribonucleotides, IV: On the possibility of the occurrence of an allosteric site on 2-deoxyribosyl aminopyrimidone-2,5'-phosphate aminohydrolase. J.biol.Chem. 238, PC 1556-1557 (1963)

42. SILBER,R.: Regulatory mechanism in the human leukocyte, I: The feedback control of deoxycytidylate deaminase.
Blood 29, 896-905 (1967)

43. SILBER,R., B.W.GABRIO, and F.M.HUENNEKENS: Studies on normal and leukemic leukocytes, VI: Thymidylate synthetase and deoxycytidylic deaminase.
J.clin.Invest. 42, 1913-1921 (1963)

44. SKOOG,L., and B.NORDENSKJOELD: Effects of Hydroxyurea and 1-ß-D-arabinofuranosyl-cytosine on deoxyribonucleotide pools in mouse embryo cells.
Eur.J.Biochem. 19, 81-89 (1971)

45. SONODA,S.: Stabilization of deoxycytidylate deaminase from mammalian tissues.
Biochim.Biophys.Acta 191, 425-429 (1969)

46. WERKHEISER,W.C.: The biochemical, cellular and pharmacological action and effects of the folic acid antagonists.
Cancer Res. 23, 1277-1285 (1963)

47. WILMANNS,W.: Bestimmung, Eigenschaften und Bedeutung der Dihydrofolat-Reduktase in den weißen Blutzellen bei Leukämien.
Klin.Wschr. 40, 533-540 (1962)

48. WILMANNS,W.: Thymidylatsynthetase in Leukämie-Zellen unter der Einwirkung von Folsäure-Antagonisten.
17. Mosbacher Kolloquium, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1966

49. WILMANNS,W.: Die Thymidinkinase in normalen und leukämischen myeloischen Zellen.
Klin.Wschr. 45, 501-511 (1967)

50. WILMANNS,W.: Dihydrofolatreductase, in:
H.U.BERGMEYER, Hrsg.: Methoden der enzymatischen Analyse, 2.Aufl., Bd. I, 617-623.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1970

51. WILMANNS,W.: Antimetabolite.
Internist 12, 127-135 (1971)

52. WILMANNS,W., und H.MARTIN: Wirkung und Verteilung von Methotrexat im menschlichen Organismus bei der Leukämiebehandlung.
Klin.Wschr. 46, 281-296 (1968)

53. WILMANNS,W., und V.NEEF: Die Thymidylat-Synthetase in weißen Blutzellen und im Knochenmark unter normalen und pathologischen Bedingungen. Klin.Wschr. 49, 755-762 (1971)

54. WILMANNS,W., and K.WILMS: DNA synthesis in normal and leukemic cells as related to therapy with cytotoxic drugs. Enzyme 13, 90-119 (1972)

55. WILMANNS,W., K.WILMS und M.F.RAJEWSKI: Biochemische Grundlagen der Behandlung von Leukosen, in: R.GROSS und J. van de LOO, Hrsg.: Leukämie, 459-477, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1972

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr.W.Wilmanns, danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für zahlreiche Anregungen und die kritische Durchsicht der Arbeit.
Ich bin Prof. Wilmanns weiterhin zu Dank verpflichtet für die in dieser Arbeit mitverwerteten Enzymbestimmungen der Thymidinkinase, Thymidylatsynthetase und Dihydrofolatreduktase.

Lebenslauf

Am 9.2.1947 wurde ich, Brigitte Schalhorn geborene Manske, als zweite der drei Töchter des Dipl.Ing. Robert Manske und seiner Ehefrau Else, geborene Stangier, in Gelsenkirchen-Horst geboren. Nach Übersiedlung der Familie nach Mülheim/Ruhr besuchte ich dort 4 Jahre die Volksschule und anschließend das Neusprachliche Mädchengymnasium bis zum Abitur im Frühjahr 1966. Nach einem Semester Studium der Biologie in Tübingen wurde ich zum Wintersemester 1966/67 zum Medizinstudium zugelassen. Ich legte in Tübingen die naturwissenschaftliche Vorprüfung, die ärztliche Vorprüfung und am 31.Juli 1972 das Medizinische Staatsexamen ab. Im Februar 1970 heiratete ich Herrn Dr.med. Andreas Schalhorn.